



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

**CINÉTICA DE LA MADURACIÓN DE LA SEMILLA DE
Capsicum chinense Jacq. RELACIONADA AL
DESARROLLO DEL FRUTO**

CANDELARIA ISABEL PÉREZ MARTÍN

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: **Cinética de la maduración de la semilla de *Capsicum chinense* Jacq relacionada al desarrollo del fruto**, realizada por la alumna: Candelaria Isabel Pérez Martín, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

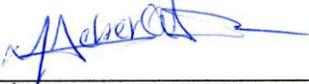
MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. OSCAR JAVIER AYALA GARAY

ASESOR


DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR


DR. LUIS LEONARDO PINZÓN LÓPEZ

ASESOR


DR. LUIS LATOURNERIE MORENO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2014

DEDICATORIA

Al amor más grande de mi vida, **mi hijo Diego Humberto**, gracias por existir y por ahora formar parte de mi vida, eres mi inspiración y mi aliciente para recobrar la energía en los momentos difíciles. Te amo y dedico a ti este logro.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente sin importarles pasar sacrificios y privaciones, por darme la oportunidad de tener lo que ellos no tuvieron “un título profesional” con todo mi amor y cariño.

A mis hermanos, que siempre han estado conmigo, por el apoyo incondicional en los momentos más difíciles de la vida, por los buenos momentos que compartimos juntos y también por los malos que supimos superar. Para todos ustedes con mucho cariño.

A Manuel, por tu amor, tu paciencia, comprensión y tu apoyo incondicional en los momentos más difíciles, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para adquirir este grado académico.

Al Colegio de Postgraduados por haberme dado la oportunidad de formarme en sus instalaciones.

Al proyecto FOMIX, Gobierno del estado de Yucatán-CONACYT YUC- 2011-C09-170237 “Madurez fisiológica, acondicionamiento de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y su efecto en el comportamiento agronómico del cultivo, por el apoyo brindado para realización de este trabajo.

Al instituto tecnológico de Conkal Yucatán por brindarme las instalaciones para realizar el presente trabajo.

A mi consejero, el **Dr. Oscar Ayala Garay**, por su confianza, paciencia, consejos, por contribuir en mi formación y sobre todo por su apoyo incondicional y amistad, muchas gracias!!

A los Doctores: **Luis Pinzón López, Luis Latournerie Moreno, Víctor Heber Aguilar Rincón**, integrantes de mi consejo particular, por su apoyo en la realización de este trabajo y la revisión del documento.

Al **Dr. Ignacio Islas** y a la **M.C Margarita Aguilar**, del Centro de Investigación Científica del estado de Yucatán por la orientación y apoyo en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de plantas.

Al **Dr. Nicasio** y al **M.C. Iván**, por el apoyo en el laboratorio de Fisiotecnia.

A la **Sra. Alicia** por su apoyo en la realización de múltiples tramites durante mi estancia en el Colegio.

A mis compañeros y amigos de la maestría, en especial a **Marcelo y Carlos** por su apoyo incondicional, muchas gracias.

Y a todos aquellos que durante estos últimos años me han brindado su amistad con una palabra o un gesto de aliento.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRAC.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 Generalidades del chile Habanero	5
3.1.1 Origen, historia y domesticación.....	5
3.1.2 Descripción botánica de <i>Capsicum chinense</i> J.....	6
3.1.3 Taxonomía.....	7
3.1.4 Propagación.....	8
3.2 Las semillas de chile	8
3.3 Desarrollo de las semillas	10
3.3.1 Histodiferenciación.....	10
3.3.2 Expansión celular y acumulación de reservas.....	10
3.3.3 Maduración – Secado.....	13
3.4 Calidad de las semillas	16
3.4.1 Vigor de la semilla.....	18
a) Prueba de germinación.....	18
b) Prueba de envejecimiento acelerado.....	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 Localización del experimento	21
4.2 Material vegetal a utilizar.....	21
4.3 Manejo del experimento.....	21
A) CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	22
4.4 Edad del Fruto	22
4.5 Variables medidas al fruto	22

4.5.1 Largo del fruto (cm)	22
4.5.2 Ancho del fruto (cm).....	22
4.5.3 Peso fresco de fruto (g).....	23
B) CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA.....	23
4.6 Factores y niveles de estudio	23
4.7 Variables de la semilla.....	24
4.7.1 Contenido de humedad (%)	24
4.7.2 Peso de 1000 semillas (g)	25
4.7.3 Germinación (%).....	25
4.7.4 Velocidad de emergencia de radículas (radículas d ⁻¹) y cinética de germinación.....	26
4.7.5 Germinación después de envejecimiento acelerado (%)	26
4.7.6 Conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ semilla)	26
4.7.7 Actividad de proteínas LEA.....	27
4.8 Diseño Experimental.....	27
4.9 Análisis Estadístico.	28
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Crecimiento del fruto.....	29
5.2 Desarrollo de la semilla y adquisición de sus parámetros de calidad.....	31
5.2.1 Contenido de humedad.....	31
5.2.2 Peso de 1000 semillas.....	33
5.2.3 Calidad fisiológica de las semillas de chile habanero.....	35
a) Germinación.....	36
b) Vigor (prueba de envejecimiento acelerado.....	37
c) Conductividad eléctrica de la solución de imbibición.....	39
d) Velocidad de emergencia de radícula.....	41
e) Cinética de la germinación.....	41
f) Actividad de proteínas LEA.....	43
5.3 Discusión general.....	45
VI.CONCLUSIONES.....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	48
VIII.ANEXOS.....	64

Anexo 1.....	64
1.1 Contenido de carbohidratos.....	64
Anexo 2.....	65
2.1 Análisis de ácido abscísico (ABA) en semillas de chile habanero por HPL.....	65

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1 Factores y niveles de estudio del experimento de chile habanero H 258 realizado en Conkal Yucatán en enero de 2013	23
2 Cuadrados medios y nivel de significancia estadística para las variables de calidad física y fisiológica de semillas de chile habanero provenientes de frutos cosechados en cinco etapas de desarrollo	35

Índice de figuras

Figura		Página
1	Eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla hasta la germinación y crecimiento, y el posible control de estos procesos en semillas tolerantes a la desecación (Kermode, 1990).	11
2	Crecimiento del fruto de chile habanero durante el ciclo invierno-primavera 2013 en Conkal Yucatán.	29
3	Aspecto de los frutos de chile habanero en las diferentes fechas de muestreo.	31
4	Contenido de humedad de semillas de chile habanero cultivado en Conkal Yucatán.	32
5	Crecimiento del peso de 1000 semillas de chile habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo	34
6	Cinética de la germinación de semillas de chile habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo.	37
7	Cinética de la germinación posterior al envejecimiento acelerado (EA) de semillas de chile habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo.	39
8	Cambios en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición de semillas de chile habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo.	40
9	Protrusión radicular en semillas de chile habanero en diferentes fases de su desarrollo.	41
10	Germinación acumulada de semillas de chile habanero frescas (A) y semillas secadas durante 10 d (B). Obtenidas en diferentes fases de su desarrollo.	42
11	Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión (E) y semilla (S) de chile habanero extraídos a los 21, 28, 36, 44 y 52 d después de antesis.	44

RESUMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo importante en la Península de Yucatán y no hay suficiente información sobre el desarrollo de la semilla de esta especie y su relación con la madurez del fruto. Este estudio se realizó para evaluar la influencia de la madurez del fruto sobre la calidad de las semillas de chile habanero; así como determinar la etapa más apropiada para obtener semillas de la más alta calidad. Las semillas se obtuvieron de frutos cosechados en cinco etapas de desarrollo (21, 28, 36, 44 y 52 DDA) en Conkal, Yucatán, 2013. Se evaluó la calidad física y fisiológica en semillas frescas (SF) y semillas secadas al ambiente por 10 d (SS) y se verificó la correlación con el grado de madurez del fruto. El fruto alcanza su máximo crecimiento a los 44 DDA, lo cual coincidió plenamente con el inicio de cambio de color del fruto, que es el indicador de la madurez fisiológica. El contenido de humedad en (SS) fue en promedio 10.9%. El peso de 1000 semillas, germinación y vigor con envejecimiento acelerado tanto en (SF) y (SS) tuvieron una función sigmoideal que alcanzó su máximo a los 44 DDA y se mantuvo al siguiente muestreo 52 DDA. La conductividad eléctrica fue disminuyendo a lo largo del ciclo de desarrollo de las (SF) y (SS) hasta alcanzar sus valores mínimos a los 44 DDA. La máxima calidad de semillas de chile habanero es de frutos cosechados a los 44 y 52 DDA.

Palabras clave: *Capsicum chinense*, germinación, calidad de semillas, madurez fisiológica.

ABSTRACT

Habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) is an important crop in the Peninsula of Yucatan. There are not studies on the relationship between seed maturity and fruit development. In this investigation, we evaluated the influence of fruit maturity on seed quality of habanero, and determined in which fruit development stage is the best time for harvesting so that the highest seed quality could be obtained. Seeds were obtained from harvested fruits at different stages of development (21, 28, 36, 44 and 52 DAA) at Conkal locality, Yucatan, 2013. Physical and physiological quality of fresh (SF) and dry (SS) seeds were evaluated at environment temperature for 10 d, and these variables were correlated to fruit development using days after fruit set. The fruit reached its largest size 44 DAA at physiological maturity when fruit skin colour changed from green to yellow. Moisture content in SS was 10.9 % in average. Weight of 1000 seeds, germination percentage, and vigour in both SF and SS using accelerated aging followed a sigmoidal function that reached a maximum from 44 to 52 DDA. The electrical conductivity of SF and SS decreased from the beginning of the growth cycle to a minimum at 44 DDA. The maximum seed quality of Habanero is obtained from fruits harvested from 44 to 52 DDA.

Keywords: *Capsicum chinense*, germination, seed quality, physiological maturity.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae* y consiste de al menos 25 especies silvestres y semicultivadas y cinco domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. annuum* (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). Actualmente, la producción se divide en dos vertientes: producción de chiles secos y de chiles frescos o verdes. Los principales países productores de chiles secos en el mundo son India con más de 1 millón de toneladas anuales; China (244,400 t año⁻¹); Perú (148,023 t año⁻¹). México figura en la onceava posición con una producción media anual de 57,430 t año⁻¹. La producción de chiles verdes o frescos está principalmente en manos de China con 13.2 millones t y México, que solía ser el principal competidor de China con 1.7 millones t anuales se ha visto desplazado por Turquía que produce 1.8 millones t (FAO, 2011).

La especie *Capsicum chinense* Jacq. (chile habanero), cuyo fruto se comercializa en fresco reporta los más altos contenidos de capsicinoides de todas las especies y tiene una importante cantidad de compuestos aromáticos que le da un sabor particular. Por ello, los frutos de este chile son utilizados por la industria farmacéutica, la de armas, la cosmética, la de pinturas, etc. (Salazar y Silva, 2004). Debido a lo anterior y a que sus características particulares le dan identidad regional, el cultivo de esta especie ha adquirido una gran importancia en la Península de Yucatán, donde en el 2010 se obtuvo la denominación de origen con el nombre de “Chile habanero de la Península de Yucatán”, en 2011 se produjeron una 900 ha. El crecimiento en la demanda del fruto provocó a su vez el aumento de la demanda de semilla.

La utilización de semillas de alta calidad constituye el primer aspecto importante para producir un cultivo rentable, y de acuerdo con la fisiología de semillas, existe un momento óptimo de cosecha para obtener una semilla con mejores características físicas y fisiológicas (Wurr y Fellows, 1983; Bino *et al.*, 1998; Doijode, 2001).

Las semillas son estructuras complejas que consisten de tres componentes principales: el embrión que desarrolla en una planta vegetativa; el endospermo que provee nutrimentos para el desarrollo del embrión durante los primeros estados de la plántula y la testa que cubre al resto de los componentes para protegerlos y controlar la germinación (Taiz y Zeiger, 2010; Baskin y Baskin, 2014). La formación de estas estructuras y la adquisición de otras características se dividen en tres fases durante el desarrollo de la semilla: i) histodiferenciación y expansión celular, ii) acumulación de reservas y iii) adquisición de tolerancia a la desecación (Baskin y Baskin, 2014).

El desarrollo de la semilla ocurre inmediatamente después de la polinización, cuando el óvulo se activa para iniciar la división celular y la histodiferenciación que formaran los tejidos del embrión y endospermo. Lo cual es seguido por flujos de agua que expanden las células formadas, llevando compuestos que permiten la síntesis y almacenamiento de reservas; la maduración se alcanza con la pérdida de agua (desecamiento de tejidos) y el desarrollo de los procesos que permiten a la semilla sobrevivir con bajos contenidos de humedad (Taiz y Zeiger, 2010).

En especies cultivadas, se considera que la madurez fisiológica de la semilla es la etapa del desarrollo en la que el peso seco alcanza su máximo, lo cual corresponde al término del periodo de acumulación de reservas, y se ha correlacionado tradicionalmente con los valores máximos de germinación y vigor. A partir de esta etapa comienza el deterioro de las semillas. Los procesos fisiológicos que ocurren en fases finales de la maduración y el secado, tradicionalmente se consideraban poco importantes para la calidad de la semilla, sin embargo, investigaciones recientes han demostrado claramente que el vigor de la semilla y su potencial de almacenamiento se incrementan después de la madurez fisiológica y que los últimas fases del desarrollo y el secado son importantes para maximizar su calidad (Bewley *et al.*, 2013).

En algunas especies la madurez fisiológica de la semilla coincide con la madurez comercial del fruto (Bewley *et al.*, 2013), en chile habanero no se conoce la relación entre la máxima calidad de la semilla y el desarrollo del fruto. Además, aunque actualmente la producción de semilla de este cultivo comienza hacerse de manera industrial en la Península de Yucatán, no existen estudios publicados sobre su desarrollo, el momento óptimo de su cosecha y la adquisición de sus atributos de calidad.

II. OBJETIVOS

I. Determinar las principales fases del desarrollo de la semilla de chile habanero

II. Conocer la cinética del establecimiento de las aptitudes de calidad de la semilla durante su desarrollo correlacionandola con las características externas del fruto

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades del chile Habanero

3.1.1 Origen, historia y domesticación

El género *Capsicum* ha sido parte de la dieta humana desde 7500 a.C. Los antepasados nativos de América ya cultivaban chile desde 5200 a 3400 a.C. El género *Capsicum* fue domesticado en diferentes partes de Sur y Centro América. Las cinco especies domesticadas son *C. annum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* (Bosland, 1996).

Se considera que *C. chinense* es la más variable de las especies domesticadas en América. Está estrechamente emparentada con *C. frutescens* y su distribución en América del Sur es similar. Su área de mayor diversidad es la cuenca Amazónica (Cheng, 1989).

Dewitt y Bosland (1994), señalan que el centro de origen de *C. chinense* es la Amazonia. El área de domesticación de *C. chinense* fue el norte de América del Sur; hallazgos arqueológicos de la cultura Chavin en la costa de Perú, 1200 a.C., indican que su cultivo es muy antiguo. Pickersgill (1971) plantea una difusión del *C. chinense* desde la cuenca amazónica hasta la costa del Perú, al mismo tiempo que se extendía la técnica para hacer cerámica. Hay restos de esta especie de chile en Huaca Prieta y Punta Grande, Perú; en el nivel estratigráfico anterior a la aparición de la cerámica. Dicho autor fecha esta difusión entre 122 a.C. y 150 d. C. Hoy día, poblaciones silvestres y cultivadas se distribuyen desde el área amazónica hasta México (León, 1987).

Aunque la especie *C. chinense* aparentemente se domesticó primero en Perú, hoy día la región de Los Andes se caracteriza principalmente por la presencia de cultivares de *C. pubescens* y *C. frutescens*. Los cultivares de *C. chinense* son muy raros, pero aún existen varias variedades locales en los trópicos peruanos. El cultivar más renombrado es “Chinchiuchu”, de frutos rojos muy picantes; y un cultivar de frutos amarillos conocidos como “ají limo” (Katzner, 2003). *C. chinense* tiene un papel importante en el arte culinario del Caribe y de África. Se introdujo al continente africano después de las primeras relaciones europeas con América. Dewitt y Bosland (1993) y Long-Solís (1998), señalan que de la Amazonia se dispersó en tiempos precolombinos a diferentes islas de la Cuenca del Caribe y de éstas, a su vez a la Península de Yucatán.

3.1.2 Descripción botánica de *Capsicum chinense* J.

El chile habanero posee una raíz principal de tipo pivotante, la cual profundiza de 0.4 a 1.2 m, con raíces secundarias extendidas en el suelo. Su tallo es erecto, de color verde con o sin coloración violeta de los nudos; con una altura de 0.3 a 1.2 m. Dependiendo de la variedad, posee 4 ramas primarias y 4 secundarias, carece de pubescencia a veces puede estar cubierto de pelos o tricomas (Alpizaret *al.*, 2003).

La planta tiene de dos a cinco flores por nódulo, con pedicelos generalmente declinantes, pero los hay erectos también. El cáliz carece de dientes, es glabro pero presenta un borde dentado marcado entre la base y el pedúnculo. El color más común de la corola es amarillo verdoso y blanco verdoso con anteras azules. El fruto puede ser de forma esférica o alargada, con

pericarpio liso o arrugado. Ciertos cultivares tienen forma de trompo, con áreas hundidas. El color del fruto puede ser blanco, anaranjado, amarillo, salmón, rojo o café. En la base del fruto es característico que el cáliz presente una constricción anular. Las semillas son arrugadas, color paja irregularmente con bordos salientes y ondulados (Cano, 2003).

3.1.3 Taxonomía

Reino: Plantae (Plantas)

Subreino: Tracheobionta (Plantas Vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (Plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (Plantas con flores)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledóneas)

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum chinense* Jacq. (USDA, 2003).

El nombre específico *chinense*, es un enigma, puesto que su procedencia americana era conocida en 1776, cuando el taxónomo francés Jacquin lo nombró, sin embargo, es probable que este científico obtuvo sus semillas de China poniéndole ese nombre (Bosland, 1996; Long-Solís, 1998).

3.1.4 Propagación

El chile habanero se propaga por semilla, las semillas tardan de 7 a 21 d para germinar. El proceso de germinación de las semillas aún bajo óptimas condiciones, puede ser lento e irregular, se necesita calor, aireación y humedad; para que los porcentajes altos de germinación ocurran se necesita entre 21 a 26.5 °C, aunque la germinación más rápida ocurre entre los 32.2 y 37.7 °C. Humedecer las semillas durante 2-3 días puede ayudar en la velocidad de la germinación (Chile Pepper Institute, 2003). Si han estado almacenadas mucho tiempo se recomienda darles un tratamiento de remojo con agua, añadiendo una cucharada de sal por litro (las semillas se dejan en ésta agua a temperatura ambiente por 2 o 3 d) (Jesiolowski, 1993). Santana *et al.*, (2002), reportaron que la germinación de la semilla que ha sido almacenada a largo plazo se favorece con la adición de ácido giberelico (AG₃). A sí mismo, Garruña *et al.*, (2014), mencionan que el acondicionamiento de semillas de *Capsicum chinense* aumenta con la adicción ácido giberelico.

Por otra parte, Bautista (2003), estudiando el efecto del aclareo de los frutos en la planta de chile habanero, encontró que la cantidad de frutos producidos por planta influye sobre la calidad de las semillas (tamaño, vigor, germinación) y que lo mejor es dejar de 20 a 40 frutos por planta con fines de producción de semilla.

3.2 Las semillas de chile

La semilla en chile representa la base para la obtención de las plántulas que se van a cultivar. El rendimiento en semillas varía mucho con el cultivar y el

vigor germinativo de las semillas es mayor cuando son colectadas de frutos pacificados que de frutos maduros o entreverados (Cavero *et al.* 1995)

Las semillas son diferentes en forma, tamaño, color y condiciones como germinación, comportamiento y latencia (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975). En Chile, las semillas tienen una forma aplastada hemidiscoidal. El lado más recto presenta el hilio. La superficie es relativamente lisa sin aspecto pubescente. La mayoría de las semillas se sitúan en la región de la placenta central y el peso y tamaño de la semilla están correlacionadas con el tamaño del fruto (Nuez, 2003). Normalmente, una semilla contiene material de reserva (carbohidratos, lípidos, proteínas) que utiliza durante el proceso de germinación, frecuentemente presente en el endospermo. En el caso de Chile, el endospermo puede contener una variedad de material almacenado como almidón, aceite, proteínas o hemicelulosa, y es la principal localización de los materiales de reserva (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975; Nuez, 2003). Las macromoléculas como proteínas y especialmente los carbohidratos son catalizadas para liberar energía metabólica usada para el reinicio de crecimiento del embrión en la germinación (Cochrane, 2000).

El embrión está curvado sobre sí mismo y consta de un eje embrionario con dos cotiledones y está constituido por la radícula dirigida hacia la región del hilio; el hipocotilo al que se unen los cotiledones curvados hacia el interior y la plúmula o epicótilo, donde se forman las primeras hojas no cotiledonares (Nuez, 2003).

Las semillas de Chile presentan un comportamiento ortodoxo, manteniéndose viables por periodos de 5-8 años a contenidos de humedad entre 4 y 6 % a temperaturas de -10°C. Los cultivares de *C. annuum* no presentan fenómenos acusados de latencia en las semillas (Nuez, 2003).

Sobre la germinación inciden diversos factores, destacando la necesidad de humedad y aireación, así como un rango térmico entre 20 y 30°C. A temperaturas próximas a 30 °C la germinación es más rápida que con temperaturas menores y a 35°C no se produce germinación (Nuez, 2003).

3.3 Desarrollo de las semillas

El desarrollo del embrión en angiospermas puede ser dividido en tres etapas fundamentales:

3.3.1 Histodiferenciación.

Durante esta etapa el cigoto sufre división mitótica y las células hijas se diferencian para formar el cuerpo básico del embrión, compuesto del eje embrionario y de los cotiledones; ocurre la formación del endospermo triploide. Los tejidos embrionarios son metabólicamente muy activos, con altos niveles respiratorios, y con los organelos subcelulares, como mitocondrias y cloroplastos, bien diferenciados (Ferrant *et al.*1993).

3.3.2 Expansión celular y acumulación de reservas.

Vacuolización: en esta etapa ocurre un periodo de expansión por vacuolización, y los tejidos de algunas semillas son muy sensibles a la desecación (Berjak *et al.*, 1993). También se caracteriza por la expansión de las células y acumulación de reservas.

En la mayoría de las semillas aumenta la tolerancia a la desecación conforme se pierde agua (Kermode y Bewley, 1985). El aumento relativo en la

tolerancia a la desecación es el resultado de la formación de nuevas membranas y organelos, así como de la acumulación de nutrientes de reserva en el citoplasma, lo que puede amortiguar algunas de las tensiones mecánicas de la deshidratación (Kermode, 1990). Es decir, existe una correlación entre la cantidad de nutrientes disponibles y el grado de tolerancia a la desecación (Lai *et al.*, 1992; Compton *et al.*, 1992). Para las semillas ortodoxas la máxima tolerancia a la desecación ocurre cuando la acumulación de reservas es máxima (Figura 1) (Bryant y Wolfe, 1989)

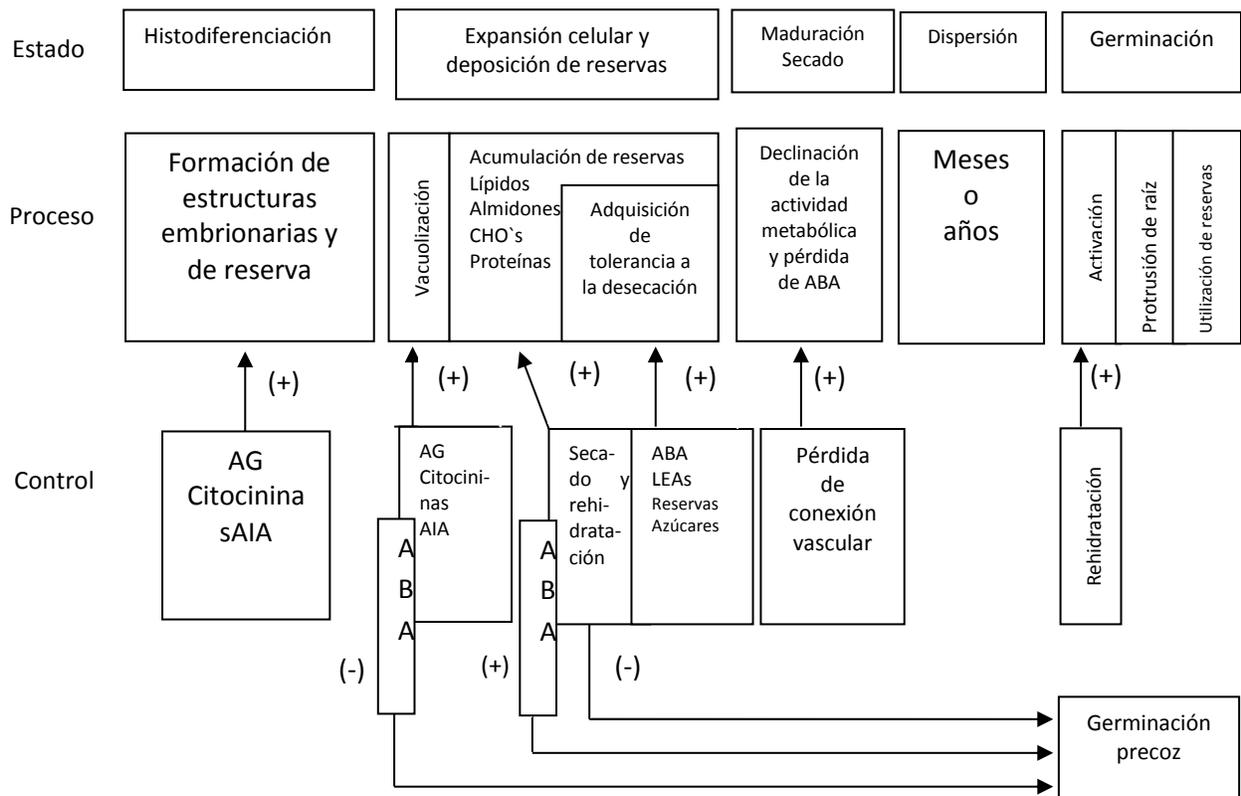


Figura 1. Eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla hasta la germinación y crecimiento, y el posible control de estos procesos en semillas tolerantes a la desecación. El signo (+) denota promoción en el evento y el signo (-) inhibición por factores concernientes (Kermode, 1990).

El desecamiento de los embriones de mangle gris (*Avicennia marina*) favorece la vacuolización a lo largo del desarrollo; en tales condiciones las proteínas y los lípidos no son acumulados y los niveles de almidón son mínimos (Ferrant *et al.*, 1993). Kermode (1990) propuso un nivel crítico de acumulación de materia seca para resistir las tensiones mecánicas del desecamiento, lo cual parece indicar la correlación entre la magnitud de vacuolización (que se asocia con un aumento en la cantidad de reservas complejas) y el grado de sensibilidad a la desecación.

Sin embargo, esta correlación no siempre se sostiene, ya que puede inducirse tolerancia a la desecación en embriones inmaduros con vacuolas no saturadas de reservas (Kermode, 1990). Además es posible que desde la división celular y la vacuolización, la germinación se aumente (Crèvecoeur *et al.*, 1988).

Diferenciación de organelos: durante la última fase de acumulación de materia seca (en semillas ortodoxas) hay una diferenciación general de organelos subcelulares como mitocondrias, cloroplastos y polisomas (Schneider *et al.*, 1993). La pérdida de la membrana de plástidos en embriones de semillas ortodoxas coincide con la tolerancia a la desecación extrema (Galau *et al.*, 1991), pero no es un fenómeno universal ya que en semillas de chícharo (*Pisum sativum*) no ocurre. Algunos investigadores consideran que la habilidad de los organelos de diferenciarse y el cese del metabolismo de una manera programada, son necesarias para lograr la tolerancia a la desecación. Pero cuando ocurre desdiferenciación y coincide con la fase de desecación, es difícil evaluar si es un requisito previo y un mecanismo de tolerancia a la desecación, o meramente una

consecuencia del tratamiento de secado (el embrión ya es tolerante a la desecación) (LePrince *et al.*, 1992).

Las reservas de la membrana: Estas reservas sirven como depósitos que se requerirán cuando el plasmalema se expande durante la imbibición y la germinación (LePrince *et al.*, 1990). El suministro adecuado de materia prima para formar membranas ayudaría a aliviar algunas tensiones mecánicas (Berjak *et al.*, 1993).

3.3.3 Maduración – Secado

La maduración generalmente concluye con un bajo contenido de humedad y una reducción gradual en el metabolismo, como consecuencia de la pérdida de agua en los tejidos de la semilla, y el embrión pasa de un estado metabólicamente inactivo (Kigel y Galili, 1995)

Navarro (1990) mencionó que la calidad fisiológica de la semilla de tomate no se afecta por el grado de madurez; pero para propósitos de rendimiento y facilidad de extracción de la semilla se recomienda el grado de madurez maduro y pasado.

Hernández (1990) en un experimento que realizó en tomate encontró efectos de grado de madurez sobre la calidad de la semilla: obteniendo para porcentaje de germinación, primer conteo de germinación, valor germinativo y peso volumétrico, los mejores resultados en semillas provenientes de un fruto en color rojo intenso, siendo estadísticamente similar a los frutos en color naranja.

Robles (1992) reportó que los más altos porcentajes de germinación y viabilidad de la semilla de chile habanero se logran al cosechar los frutos en color naranja y pinto, y con un tiempo de postmaduración de 7 días.

La deshidratación de la semilla contribuye a la dispersión de esta y permite su sobrevivencia durante largos periodos (Bradford, 2004). La tolerancia a la desecación está dada por la síntesis de proteínas y azúcares específicos que aunque se sintetizan durante la fase inicial del desarrollo, cuando el contenido de ácido abscísico es aún elevado, su acumulación se acelera durante la deshidratación, alcanzando el máximo en la madurez.

El disacárido trealosa es importante en la adquisición de tolerancia a la desecación porque cuando hay estrés hídrico, la estructura del disacárido le permite reemplazar al agua en la membrana celular y así mantener su estructura. Este carbohidrato también mantiene la estructura de algunas proteínas durante la deshidratación y evita su desdoblamiento y desnaturalización. En algunas semillas la trealosa está ausente; en estos casos, la sacarosa en conjunto con algunos oligosacáridos puede realizar la función de ésta al crear un estado vítreo en tejidos secos que disminuye la velocidad de las reacciones químicas que promueven la degradación de los componentes de la semilla (Buitink *et al.*, 2002).

En cuanto a las proteínas que se conocen como abundantes en embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés), estas se caracterizan por componerse de aminoácidos hidrofílicos que las hacen solubles en agua y resistentes a la desnaturalización causada por las altas temperaturas. Se han encontrado evidencias de la presencia de estas proteínas en otros órganos de la planta como respuesta a estrés ambiental y a la acumulación de ácido abscísico;

esto sugiere que estas actúan en el mantenimiento de la conformación de la membrana celular durante la deshidratación (Bewley y Black, 2000; Bradford, 2004).

En semillas de chile dulce se observó la ausencia de LEAs en los estados iniciales de madurez de la semilla (40 dda). Estas proteínas se expresaron con poca intensidad en semillas obtenidas de frutos cosechados 50 dda y almacenados 12 d. En semillas de 60 y 70 dda las proteínas se hicieron presentes en mayores cantidades indicando que su acumulación ocurre después del estado de maduración del fruto pues se asociaron a la etapa de madurez fisiológica, donde la semilla inicia con la adquisición de tolerancia a la desecación (Vidigal *et al.*, 2009).

Las proteínas LEA, originalmente fueron descritas en las semillas de algodón; se acumulan en grandes cantidades en estructuras tolerantes a la desecación (semillas, polen) y en tejidos vegetativos sometidos a estrés abiótico, sequía, salinidad y frío. También se hallan en organismos anidrobióticos, en plantas de resurrección, algunos invertebrados y microorganismos. La presencia de proteínas LEA se correlaciona con la adquisición de tolerancia a la desecación. Desde un principio se les atribuyó un papel en las respuestas de las plantas en la adaptación al estrés (Shih *et al.* 2008).

Las proteínas LEA se clasifican en diversos grupos en función de dominios y secuencias de aminoácidos específicos. Los grupos 1, 2 y 3 son los más relevantes ya que abarcan la mayoría de las proteínas de la familia LEA. Una característica general de estas proteínas es su elevada hidrofiliidad, alto contenido de aminoácidos cargados y su falta de estructura en estado hidratado. A

pesar de encontrarse mayoritariamente en forma de “random coil”, algunas adquieren un cierto grado de estructura durante la deshidratación o en la presencia de agentes promotores de α -hélices (Shih *et al.* 2008). A nivel celular se han hallado en todas las localizaciones, citosol, núcleo, nucléolo, mitocondria, cloroplasto, vacuola, retículo endoplásmico, peroxisoma y membrana plasmática, donde se supone ejercen su función protectora frente al estrés (Tunnacliffe y Wise 2007, Hundertmark y Hinch 2008). En relación a las modificaciones post-traduccionales, algunas se hallan fosforiladas (Jiang y Wang 2004, Heyen *et al.* 2002, Rohrig *et al.* 2006). Los efectos protectores de las varias proteínas LEA se han demostrado mediante ensayos *in vitro* y en aproximaciones transgénicas que han dado lugar a fenotipos resistentes a la sequía, sal y frío. Por lo general, se considera que estas proteínas contribuyen a la protección y a la estabilización de macromoléculas y estructuras celulares en las respuestas de adaptación al estrés en plantas; sin embargo, sus funciones específicas aún no han sido esclarecidas. A nivel molecular se ha propuesto que las funciones de las proteínas LEA.

3.4 Calidad de las semillas

Khan (1977) denota que el concepto de calidad de semilla involucra diferentes aspectos, tales como homogeneidad genética, apariencia física, buen estado fitosanitario y uniformidad, viabilidad de semilla y además, buenos resultados en campo, traducidos en emergencia, desarrollo de plantas, crecimiento y rendimiento; ante esto, Doijode (2001) afirma que semillas vigorosas producen plantas fuertes, uniformes y saludables que tienen un mejor desarrollo en su establecimiento y adicionalmente exhiben relativamente una

mayor longevidad.

La calidad de semilla se puede ver afectada por un sinnúmero de factores genéticos, fisiológicos y citológicos, así como patológicos y mecánicos (Khan, 1977); por eso siempre que se habla de calidad de la semilla, se referirá a la calidad genética, física, fisiológica y sanitaria de la misma.

La calidad genética es un factor que corresponde a la fidelidad con la que la semilla transmite sus características genotípicas de la variedad, tales como la identidad y la pureza genética (García, 1981).

En la calidad sanitaria se considera el estado en el que se encuentra la semilla en relación a la presencia de plagas y enfermedades debiendo estar libre de daños por hongos, bacterias, virus e insectos (García, 1981).

La calidad física se refiere a las características observables o factibles de medir en la semilla; consiste en determinar el contenido de humedad, el peso por volumen y la pureza de la semilla. Adicionalmente se menciona el color, tamaño y forma como componentes de calidad (García, 1981).

González (1994) define la calidad fisiológica como la facultad de la semilla para germinar, emerger y dar origen a plantas uniformes y vigorosas bajo un amplio rango de condiciones que pueden encontrarse al momento de la siembra. La calidad fisiológica es uno de los factores más importantes, puesto de esta depende el éxito de las semillas en campo y es el tipo de calidad que con mayor frecuencia se pierde ya que incluye aspectos como viabilidad, poder germinativo y vigor.

3.4.1 Vigor de la semilla

El vigor ha sido definido como la sumatoria total de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de éstas o de un lote de semillas durante la germinación y emergencia de las plántulas. Las semillas que muestran un buen comportamiento son consideradas de alto vigor, y aquellas que presentan un pobre comportamiento son de bajo vigor (ISTA, 2004).

El vigor juega un papel muy importante durante el almacenamiento de semillas. Las que son vigorosas poseen un mayor potencial de almacenamiento y se preservan bien por largos periodos hasta que pierden su viabilidad, ya que la viabilidad tiende a reducirse gradualmente durante el almacenamiento. El vigor es un término usado para estimar la calidad de las semillas; cuando están vigorosas producen plántulas uniformes, fuertes y sanas que tienen mejor establecimiento en campo y muestran relativamente mayor longevidad (Doijode, 2001).

El vigor de semillas generalmente es evaluado por las siguientes pruebas: crecimiento de plántulas, velocidad de germinación, medición de solutos en semillas, consumo de oxígeno y liberación dióxido de carbono (actividad respiratoria), tetrazolio, prueba de la actividad del ácido glutámico descarboxilasa (GADA) y diferentes tipos de pruebas de estrés, entre otras (Doijode, 2001).

a) Prueba de germinación

Esta prueba es una de las más ampliamente usadas para estimar la germinabilidad de las semillas. Usualmente la germinación se establece en papel, arena o en otro medio con condiciones cálido-húmedas. Estima el máximo porcentaje de semilla capaz de desarrollarse en plántulas sanas. Los procesos de

germinación varían para diferentes cultivos y han sido estandarizados por la International Seed Testing Association (ISTA) y la Association of Official Seed Analysts (AOSA) (Mullen, 2003).

b) Prueba de envejecimiento acelerado

La prueba estándar de germinación con frecuencia sobreestima la germinación que ocurre en el campo, porque las condiciones en este para la germinación son usualmente más estresantes que aquellas usadas para la prueba de germinación en laboratorio. Se han desarrollado diversas pruebas de vigor que estiman la calidad de un lote de semillas que será sembrado en campo.

La prueba de envejecimiento acelerado es una de las pruebas de vigor de semillas más comunes, y en esta las semillas son expuestas a altas temperaturas (41 °C aproximadamente) y 100 % de humedad relativa por 3 a 5 d, seguida de una prueba de germinación en condiciones óptimas. Esta prueba es usada para estimar el potencial de germinación en las condiciones de estrés que la misma confiere (Mullen, 2003). Asimismo, permite estimar el deterioro que la semilla sufre en almacenes y el vigor de la misma, y puede aplicarse a cualquier tipo de semilla ya que esta prueba puede producir información de calidad en forma constante (Delouche y Baskin, 1973; Copeland y McDonald, 2001).

Esta prueba frecuentemente se lleva a la par o se mide con un ensayo de velocidad de emergencia, la cual consiste en poner a germinar semillas en arena o en papel. Diariamente se cuenta el número de plántulas normales emergidas hasta alcanzar una población constante. Posteriormente, mediante una expresión

matemática se calcula la velocidad de emergencia, según la cual el lote con mayor velocidad, será el más vigoroso (Copeland y McDonald, 2001).

Para especies de semilla relativamente pequeña, como la mayoría de las hortalizas, la prueba de envejecimiento acelerado puede presentar ciertas limitaciones; ya que las semillas pequeñas absorben agua más rápida y desuniformemente durante el periodo de envejecimiento, lo que puede acelerar el proceso de deterioro o resultar en un comportamiento variable entre las semillas de una muestra, interfiriendo en la precisión de los resultados (Bhering *et al.*, 2006). En virtud de lo anterior, Jianhua y McDonald (1996) propusieron un método modificado usando soluciones salinas saturadas en sustitución de agua, lo que permite reducir las humedades relativas en la prueba, obteniéndose niveles específicos de humedades relativas dependiendo de la solución utilizada. Además esto permite la absorción de agua a una velocidad e intensidad más baja, por lo que el proceso de deterioro es menos drástico. La eficiencia de este procedimiento ha sido probada en semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) (Panobianco y Marcos-Filho, 1998) y en semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Bennet *et al.*, 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del experimento

La fase de campo del presente estudio se realizó en un invernadero de producción de hortalizas del Instituto Tecnológico de Conkal (ITC), Yucatán, 19° 20' LN y 20° 37' LO, a una altura de 10 msnm. El clima predominante es el cálido sub-húmedo con lluvias en verano AWO (x') (l') g (CONAPO, 1994). La temperatura media anual es de 26.5 °C con una precipitación media anual de 900 mm.

4.2 Material vegetal a utilizar

Se utilizó semillas de chile habanero de la variedad experimental H258, proporcionada por el programa de Recursos Genéticos de Chile Habanero del ITC.

4.3 Manejo del experimento

El establecimiento del cultivo se realizó en la primera semanas de enero de 2013. Se sembraran 200 semillas chile habanero en charolas de unicel desinfectadas con cloro al 5 %. El sustrato utilizado fue sustrato comercial cosmo peat[®]. Se regaron y fertilizaron con Polyfeed[®] (19-19-19) cada tercer día con dosis de 1 g L⁻¹. Se mantuvieron en el invernadero hasta los 45 días. En este momento se realizó el trasplante en surcos sencillos, la separación entre las plantas fue de 30 cm y 1.50 m entre surcos. El riego se aplicó utilizando un sistema localizado

por goteo tipo cintilla. La fertilización y el control de plagas y enfermedades se realizó de acuerdo al paquete tecnológico propuesto por Soria *et al* (2000).

A) CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO

4.4 Edad del Fruto

Para controlar la edad del fruto se marcaron flores al momento de la antesis con etiquetas de colores colocados en la región cercana al pedicelo, indicando la fecha de aparición de esta y la fecha en que se colectó el fruto.

A los 21, 28, 36, 48 y 52 d después de antesis (DDA) se obtuvieron 120 frutos que fueron cortados manualmente del primer y segundo estrato de la planta. Se tuvo especial cuidado en que los frutos tuvieran buenas condiciones sanitarias.

4.5 Variables medidas al fruto

En 16 frutos se midieron:

4.5.1 Largo del fruto (cm)

Se midió con un vernier electrónico (TRUPER, CHINA), desde la base del pedúnculo del fruto hasta la parte terminal del fruto.

4.5.2 Ancho del fruto (cm)

Se midió después de realizar un corte longitudinal del fruto, se consideró de un extremo a otro en la parte central.

4.5.3 Peso fresco de fruto (g)

Se pesó en una balanza de precisión (Ohaus, EE. UU.).

B) CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA

4.6 Factores y niveles de estudio

En cuanto a la semilla se estudió el efecto de dos factores con sus respectivos niveles, los cuales se presentan en el siguiente Cuadro 1:

Cuadro 1. Factores y niveles de estudio del experimento de chile Habanero H258 realizado en Conkal, Yucatán en enero de 2013.

FACTOR	NIVELES
Desarrollo del fruto	21 DDA
	28 DDA
	36 DDA
	44 DDA
	52 DDA
Periodos de almacenamiento	Semilla fresca (0 DDE)
	Semilla secada 10 DDE

DDA = Días después de antesis; DDE = Días después de extracción

La extracción de las semillas se realizó de forma manual, en una cámara de extracción de gases debido al picor del fruto y sus componentes. Se cortó

transversalmente el fruto, cuidando de no dañar la semillas, posteriormente se extrajo la semillas con la ayuda de unas pinzas.

4.7 Variables de la semilla

4.7.1 Contenido de humedad (%)

Se utilizó el método de secado a la estufa a 130 °C, para esto se utilizaran 2 repeticiones de 50 semillas cada una. Para cada repetición se pesó una caja de aluminio y su tapa (P1) en una balanza analítica, después se depositó las semillas en la caja, se tapó inmediatamente y se pesó nuevamente (P2).

Se colocó la caja conteniendo las semillas en una estufa (Thelco 31480, EE. UU.) a la temperatura correspondiente durante 1 h. Al termino del tiempo de exposición, se pesaron nuevamente obteniéndose el P3. El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente formula.

$$\frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100 = \% \text{ de humedad}$$

4.7.2 Peso de 1000 semillas (g)

Para esta prueba se contabilizo ocho repeticiones de 100 semillas cada una al azar, se pesó cada repetición y se obtuvo el valor en gramos.

Se obtuvo la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación de la siguiente manera:

$$1. \text{ Varianza} = \frac{N(\sum X^2) - (\sum X)^2}{N(N-1)}$$

Donde

X= Peso (g) de cada repetición

N= Numero de repeticiones

$$2. \text{ Desviación típica (S)} = \sqrt{\text{Varianza}}$$

$$3. \text{ Coeficiente de variación} = \frac{S}{\bar{X}} (100)$$

Donde:

$\frac{S}{\bar{X}}$ = Media de peso de cien semillas

Si el coeficiente de variación no excede de 4.0, el resultado de la prueba será aceptado y calculado con la siguiente formula.

$$\text{Peso de 1000 semillas} = \left(\frac{S}{\bar{X}}\right) 10$$

Debido al alto contenido de humedad de las semillas al inicio de su desarrollo y al sacarse del fruto para medir esta variable, se decidió expresar esta variable en g de materia seca.

4.7.3 Germinación (%)

Se realizó una prueba de germinación estándar en un cuarto a 25 ± 1 °C, con luz constante; se emplearon cuatro repeticiones de 25 semillas colocadas en una capa de papel absorbente humedecidas con agua destilada, en cajas Petri. Con el total de semillas germinadas a los 21 d de establecida la prueba se calculó el porcentaje de germinación (PG).

4.7.4 Velocidad de emergencia de radículas (radículas d⁻¹) y cinética de germinación

En la prueba de germinación, diariamente se contabilizaron las semillas germinadas (con protrusión de la radícula) hasta los 21 d, lo que permitió observar la cinética de la germinación. La velocidad de germinación o velocidad de emergencia de radículas (VG) se calculó como:

$$VG = \sum(n_i/t_i),$$

donde n_i es el número de plántulas germinadas durante el intervalo t_i , que es el tiempo desde la siembra hasta el día de conteo (ISTA, 2004).

4.7.5 Germinación después de envejecimiento acelerado (%)

Se utilizaron cajas de plástico de 12 x 12 x 6 cm, a las que se les agregaron 80 mL de agua destilada, colocando una malla de alambre por encima del nivel del agua como medio de soporte de las semillas y así evitar el contacto de éstas con el agua. En cada caja se depositaron 100 semillas y se mantuvieron en una incubadora a 42 ± 0.5 °C por 48 h (Bhering *et al.*, 2006). Después del período de envejecimiento se realizó una prueba de germinación estándar como se describió anteriormente.

4.7.6 Conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ semilla)

Se utilizaron cuatro repeticiones de 50 semillas, cada repetición se sumergió en 50 mL de agua desionizada con una conductividad eléctrica de $2 \mu\text{S cm}^{-1}$ y se incubaron durante 24 h a 25 °C. La conductividad eléctrica de la solución de remojo se midió utilizando un medidor de conductividad (Corning 1413).

4.7.7 Actividad de proteínas LEA

Esta determinación se realizó siguiendo el protocolo de Vidigal *et al.* (2009). Se utilizaron semillas de frutos frescos. Inicialmente, las semillas se pusieron en imbibición por 30 min, en agua corriente para la extracción del embrión.

Las proteínas LEA se extrajeron moliendo 100 mg de embriones en 1 mL de tampón de extracción (50 mM Tris-HCL-7.5; 500 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM PMSF) usando un mortero y nitrógeno líquido. El triturado molido se transfirió a microtubos de 1500 µL y se centrifugo (16000 g) durante 30 min a 4 ° C.

El sobrenadante se calentó durante 15 minutos a 85 ° C, a baño maría y luego se centrifugo nuevamente como se mencionó anteriormente. El sobrenadante se transfirió a un microtubulo.

Para la electroforesis, se mezcló 70 µL del extracto embrionario con 40 µL del buffer (2,5 mL de glicerol, 0,46 g SDS, 20 mg de azul de bromofenol) y el volumen de final se ajustó a 20 mL con el tampón de extracción. La mezcla se puso a hervir durante 5 min y posteriormente se aplicó 60 mL de la mezcla a cada pocillo del gel de SDS-PAGE (12.5, gel separador, 6 concentración del gel). Se realizó la electroforesis a 120 V y el gel se tiñó durante 12 h en una solución que contiene azul de 0.05% de azul de Coomassie y 10% de teñido de ácido acético (Alfenas, 2006).

4.8 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar factorial 5 x 2 mencionados en el cuadro 1.

4.9 Análisis Estadístico.

Se realizaron pruebas de homogeneidad y análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de Tukey, considerando un experimento con los factores y niveles, señalados en el Cuadro 1, para las variables de calidad fisiológica de semillas (germinación, velocidad de emergencia de radículas, germinación después de EA y conductividad eléctrica) . Los datos expresados en porcentaje se sometieron a una transformación consistente en aplicar la raíz cuadrada del arco seno del dato en porcentaje, con la finalidad de que cumplan con los supuestos del análisis de la varianza y ser objeto de análisis. Se usaron los programas Excel[®] 2011 (Microsoft, Inc. EE.UU) y Statistical Analysis System versión 9.1.3 (SAS, 2003) para la captura y análisis de datos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Crecimiento del fruto

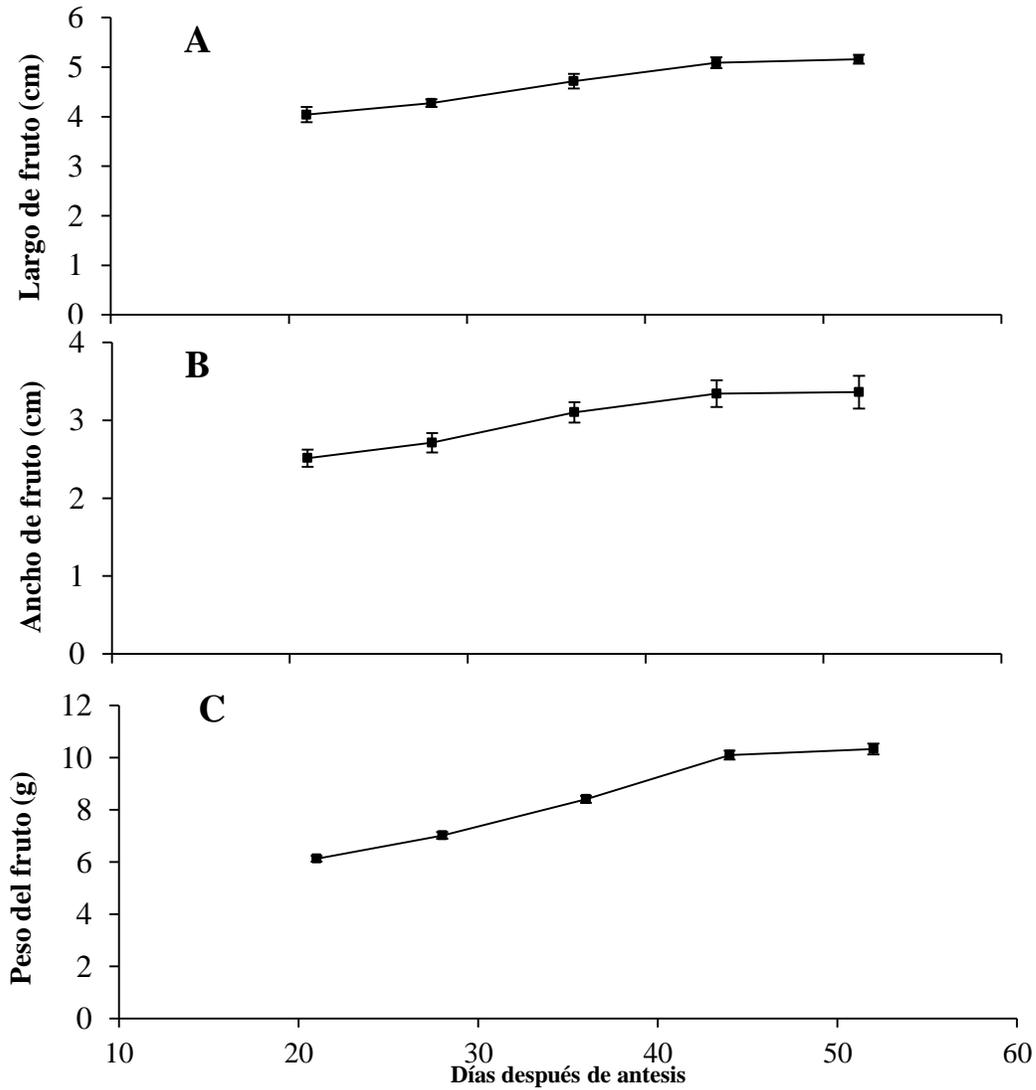


Figura 2. Crecimiento del fruto de chile habanero durante el ciclo invierno-primavera 2013. Conkal, Yucatán. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

El fruto presenta un crecimiento de tipo sigmoideal que alcanza su máximo a los 44 DDA. No se registraron datos antes de 21 DDA, cuando aparentemente existe un mayor aumento de longitud (Figura 2A) y ancho (Figura 2B) del fruto. Lo anterior puesto que el trabajo de investigación se interesaba más al desarrollo de la semilla que del fruto.

En la Figura 3 se muestran imágenes del fruto en las diferentes fechas de muestro. De acuerdo con estas imágenes a los 42 DDA el fruto alcanzó las características de inicio de cambio de color, que es el indicador de la madurez fisiológica del fruto y puede ser cosechado para su comercialización. Lo cual coincide plenamente con la fecha en la que se encontraron las características de máximo del fruto, como se mencionó anteriormente.

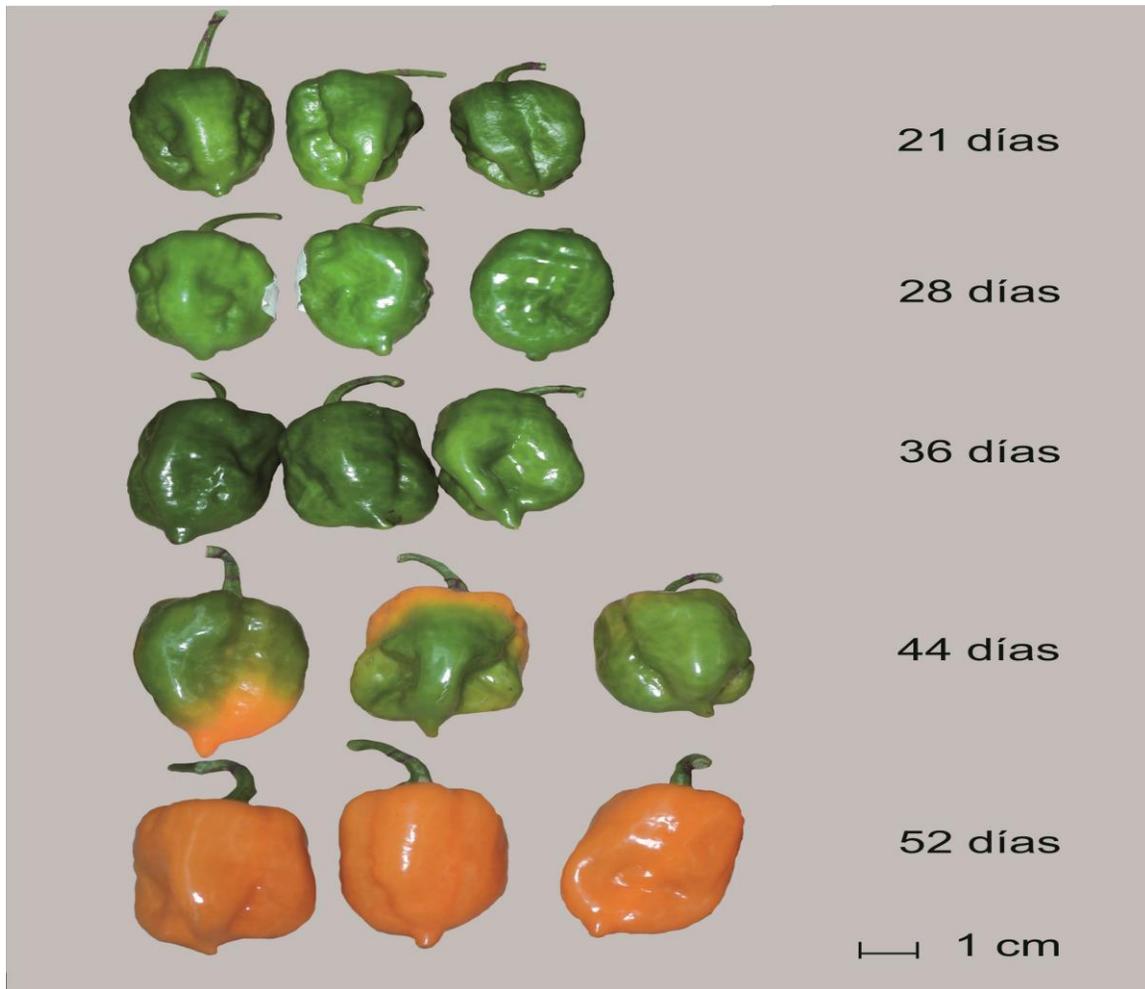


Figura 3. Aspecto de los frutos de chile habanero en cinco etapas de madurez

A los 52 DDA, el fruto tiene las características óptimas buscadas en el mercado, el color naranja brillante (Figura 3).

5.2 Desarrollo de la semilla y adquisición de sus parámetros de calidad

5.2.1. Contenido de humedad

En la semilla secada durante 10 d (Figura 4), el contenido de humedad fue en promedio 10.9 % con un coeficiente de variación de 0.06, lo que expresa muy

poca variabilidad. Esto es debido a que la semilla se puso en equilibrio con la humedad del ambiente.

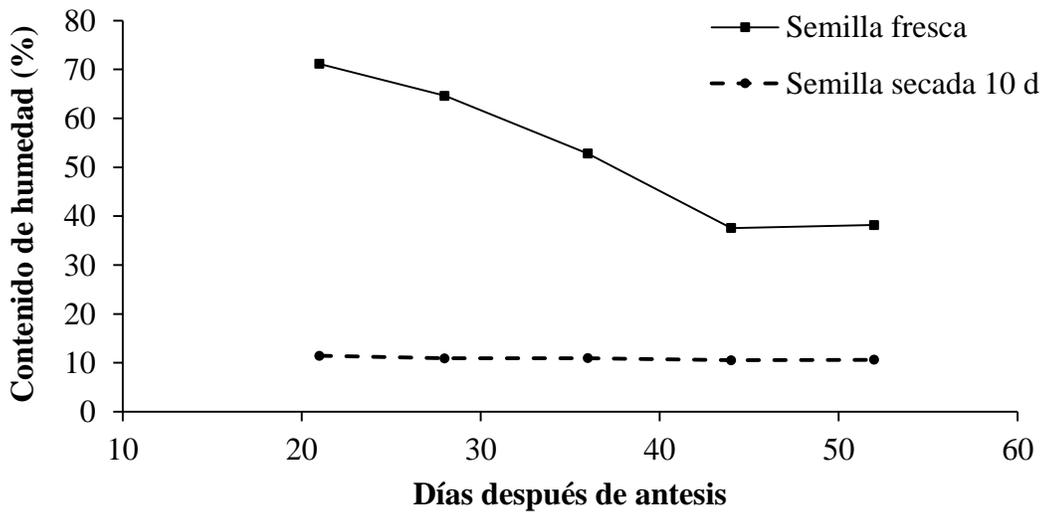


Figura 4. Contenido de humedad de semillas de chile habanero cultivado en Conkal, Yucatán.

En cuanto a las semillas extraídas e inmediatamente puestas a germinar (semilla fresca), las obtenidas a los 21 DDA eran inmaduras, mucilaginosas, delgadas y con contenido de humedad mayor al 70 %. Entre los 28 y los 44 DDA ocurrió una reducción rápida de la humedad de las semillas, hasta de 38 % a los 44 DDF. En este muestreo y en el último (52 DDA), las semillas dentro del fruto mantuvieron una humedad cercana a 38 % (Figura 3). Lo anterior indicaría que mientras se mantienen en el fruto, las semillas alcanzan un punto de equilibrio de 38 % en su contenido de humedad. Pérez-Camacho *et al.* (2008) observaron este mismo punto de equilibrio en semillas de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot.) el

cual se alcanzó al 45 % de contenido de humedad. Al respecto, Modi y White (2004) reportaron en jitomate tipo Cherry que durante la madurez de la semilla ocurre un flujo de salida de agua hacia la placenta, flujo que probablemente esté asociado con uno de entrada de azúcares solubles, que permite la deposición y acumulación de reservas (Bewley *et al.*, 2013).

Tanto el chile habanero como el tomate verde y el jitomate pertenecen a la familia botánica de las solanaceas y poseen frutos carnosos; mientras su semilla esta dentro del fruto puede mantener un alto contenido de humedad, el cual desciende rapidamente al sacarse del fruto en el momento de la cosecha. El efecto de este desecamiento rápido fue estudiado parcialmente por Pérez-Camacho *et al.* (2008) concluyendo que un secado con aire a temperatura ambiente o con aire caliente (25 °C) puede afectar negativamente el vigor de la semilla.

5.2.2 Peso de 1000 semillas

El incremento del peso de la semilla se puede considerar como un indicador de la cantidad de reservas almacenadas en la semilla, en efecto, la semilla es una de las principales demandas fisiológicas en la planta y los fotosintatos provenientes de la fuente fotosintética inmediatamente después de la polinización son usados para abastecer de carbono y energía a la división celular y la síntesis de membranas y paredes celulares durante el proceso de histodiferenciación y posteriormente para sintetizar macromoléculas de reserva, es por ello que el peso de 1000 semillas (Figura 5) es una variable que puede señalar las principales fases que la semilla atraviesa durante su desarrollo.

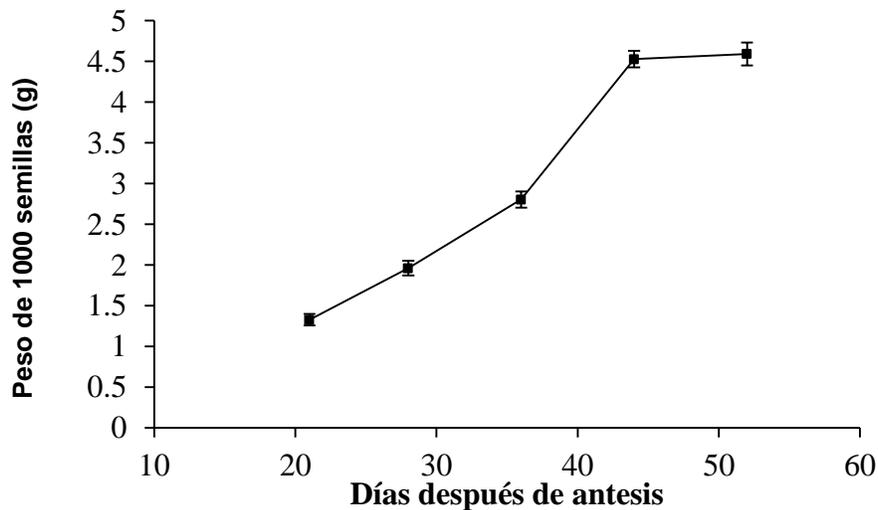


Figura 5. Crecimiento del Peso de 1000 semillas de chile Habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

El peso de 1000 semillas (Figura 5) se incrementa, de manera sigmoïdal sin tener una fase apreciable de crecimiento exponencial, es decir de mayor velocidad de crecimiento. Se puede considerar que el crecimiento es constante, desde los 21 DDA, cuando se iniciaron los muestreos en este trabajo experimental y hasta los 44 DDA cuando llega a un máximo que se mantiene en el siguiente muestreo que se realizó (52 DDA). Es claro que a los 44 DDA se llega al final de la fase de acumulación de reservas en la semilla de chile habanero, fase enunciada por Bewley *et al.* (2013) al hablar del desarrollo de semillas en general. Bradford (2004) señala que la importancia de evaluar el peso, radica en que es un indicador de la calidad física y que un cultivo con deficiencia de nutrimentos y agua, daño

por heladas o granizo, plagas y enfermedades, producirá semilla de menor peso. Conforme la semilla se acerca a su madurez, existe una acumulación de reservas que la hace más pesada además de que mientras las condiciones de crecimiento son favorables, el crecimiento de la semilla es constante y su estancamiento depende de los factores que determinaran la senescencia del fruto (Rodríguez *et al.*, 2011).

5.2.3 Calidad fisiológica de las semillas de chile habanero

En el Cuadro 2 se muestran los resultados del análisis de varianza de las variables de calidad fisiológica de la semilla. Las fuentes de variación resultaron significativas en su efecto sobre de variables evaluadas. Si se consideran los valores de los cuadrados medios, el principal factor de influencia en las variables es el desarrollo del fruto (d después de anthesis a cada muestreo).

Cuadro 2. Cuadrados medios y nivel de significancia estadística para las variables de calidad física y fisiológica de semillas de chile habanero provenientes de frutos cosechados en cinco etapas de desarrollo.

Fuentes de Variación	GL	G (%)	G-EA (%)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Desarrollo del fruto (A)	4	875.31*	813.78*	140346.02*
Periodos de almacenamiento (B)	1	150.00*	15.87*	473.68*
A*B	4	12.46*	8.65*	553.97*
Error	30	0.96	0.75	22.48

CV (%)	6.49	11.83	1.74
---------------	------	-------	------

* Significativo a $P < 0.05$; G = Porcentaje de germinación; G-EA = Germinación posterior a la prueba de Envejecimiento Acelerado; CE= Conductividad eléctrica.

a) Germinación

La cinética de la germinación a lo largo del desarrollo de la semilla sigue una función sigmoideal caracterizada por una fase donde el crecimiento de la curva es muy bajo o no existe, seguido de un crecimiento exponencial que concluye con una fase donde el crecimiento de la curva se detiene completamente (Figura 6). El porcentaje de germinación aumentó a partir de los 28 DDA conforme el tiempo después de polinización aumentó, hasta un máximo alcanzado a los 44 DDA. Sorprendentemente, la germinación de semillas secadas 10 d fue inferior al de las semilla fresca, recién extraída y puesta a germinar. Lo anterior es contrario a lo encontrado por Pérez-Camacho *et al.* (2008) en semillas de tomate verde (*Physalis ixocarpa*) quienes observaron que la semilla recién extraída germinaba significativamente en menor porcentaje que la secada a 20 °C. Dos explicaciones posibles se pueden dar a nuestros resultados. Posiblemente un secado muy brusco ocasionó que una parte de la semilla secada durante 10 d se deteriorará y no germinara por daños en membranas u otros órganos internos (Bewley *et al.*, 2013). La segunda explicación posible se relaciona con observaciones encontradas por Garruña *et al.* (2014) que muestran que algunas variedades de Habanero pierden rápidamente su capacidad germinativa si la semilla no se almacena en condiciones específicas, dicha capacidad se recupera aplicando

hormonas como el ácido giberélico, lo que muestra que la semilla estaría latente. En algunas especies, la germinabilidad inicial de la semilla se ve rápidamente disminuida debido a la síntesis de inhibidores como ABA y el ácido jasmónico, lo que provoca una entrada en latencia de dicha semilla, la semilla sigue estando viva pero no germina, a este fenómeno se le conoce como latencia secundaria (Hilhorst, 2007).

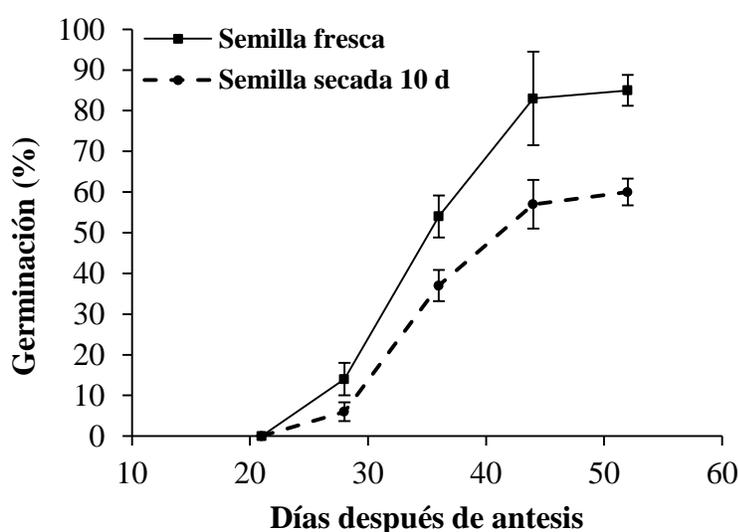


Figura 6. Cinética de la germinación de semillas de Chile Habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

b) Vigor (prueba de envejecimiento acelerado)

El vigor se considera como el último parámetro de la calidad fisiológica que la semilla adquiere durante su formación (Bewley *et al*, 2013) y el que el más fácil pierde durante el deterioro. Para evaluar el vigor de la semilla, se han desarrollado

diversas pruebas de laboratorio. Una serie de pruebas tratan de predecir la emergencia de plántulas bajo las condiciones estresantes encontradas en campo. En la mayoría de esas pruebas las semillas se someten a diferentes tipos de estrés, determinándose al final la cantidad de plántulas normales capaces de desarrollarse bajo estas condiciones. Como el vigor se puede correlacionar con el deterioro de semilla, las pruebas de deterioro controlado o envejecimiento acelerado (EA) son usadas, por una parte, como pruebas para evaluar la calidad fisiológica de las semillas. Por otra parte, se asume que el proceso de deterioro bajo envejecimiento artificial es similar a las ocasionadas por el deterioro natural (Nagarajan y Pandita, 2001). En el caso de nuestro experimento, la máxima germinación observada después del envejecimiento acelerado es 53% en semilla fresca y 39 % en semilla secada a los 10 d (Figura 7), valores que se encuentran en semilla con un desarrollo de 44 DDA. La germinación desciende un punto porcentual en ambos tratamientos en el último muestreo, lo cual no es significativo.

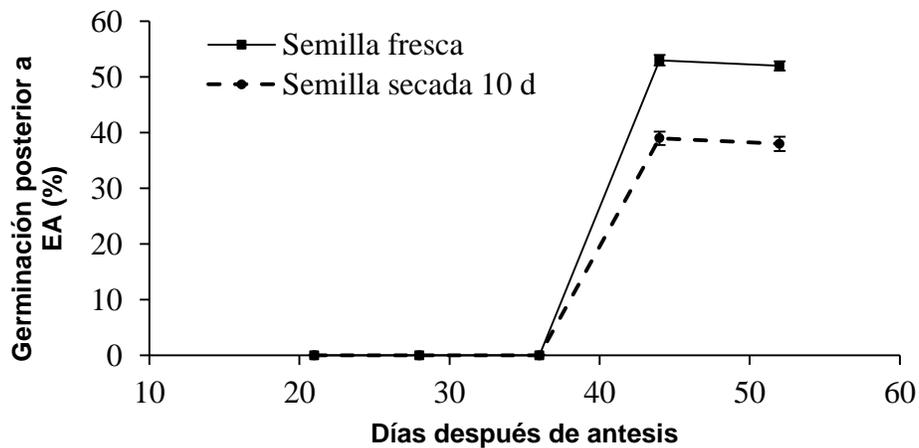


Figura 7. Cinética de la germinación posterior al envejecimiento acelerado (EA) de semillas de chile Habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo. Las barras horizontales representan la desviación estándar.

c) Conductividad eléctrica de la solución de imbibición

Tradicionalmente esta prueba se utiliza como indicador de la viabilidad de la semillas (ISTA, 2004). Al medir conductividad eléctrica (CE) de la solución de imbibición se miden los solutos liberados por las semillas, lo cual es inversamente proporcional a la viabilidad de estas; ya que se considera que una mayor CE indica la organización o integridad de las membranas es deficiente. En este trabajo de investigación la disminución de la CE (Figura 8) indicaría mejoras en la organización de la membrana durante el proceso de maduración (Vidigal *et al.*, 2009).

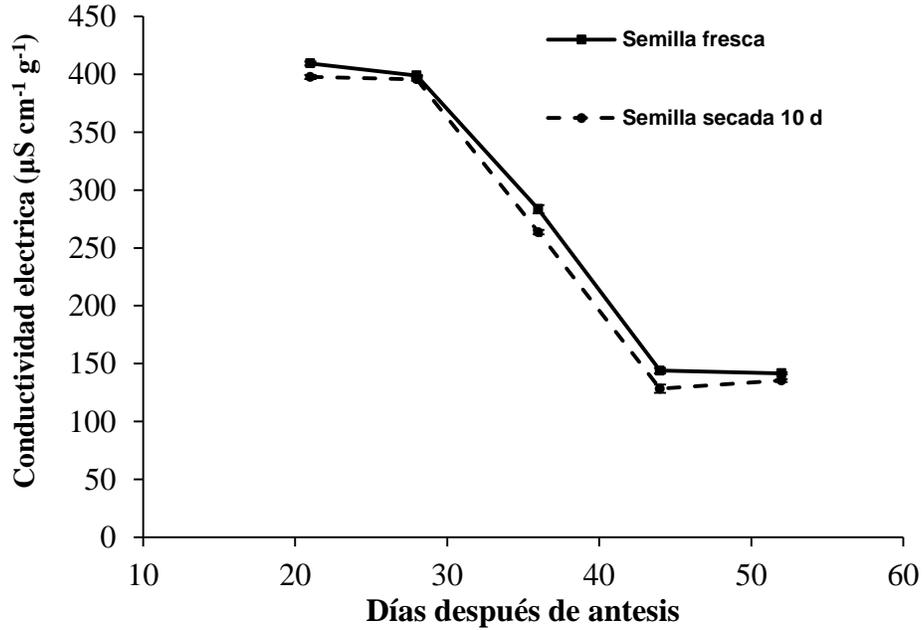


Figura 8. Cambios en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición de semillas de Chile Habanero H-258 en diferentes fases de su desarrollo. Las barras horizontales representan la desviación estándar

La conductividad eléctrica fue disminuyendo a lo largo del ciclo de desarrollo de la semilla (Figura 8). Hasta alcanzar sus valores mínimos a los 44 DDA. Vidigal *et al.* (2009) reportaron en *Capsicum annum* que la conductividad eléctrica de las semillas disminuye durante el proceso de maduración de los frutos; considerando que una conductividad eléctrica baja indicaría la existencia de una buena organización de la membrana celular, lo cual favorecería al proceso de germinación.

d) Velocidad de emergencia de radícula

La velocidad de germinación mayor se obtuvo en semilla fresca a los 44 DDA con 2.08 semilla. día⁻¹ (Figura 9), las semillas obtenidas a los 21 DDA, tanto en semilla fresca como en semilla secada por 10 d, fueron incapaces de germinar por tratarse de semillas inmaduras como ya se explicó anteriormente.

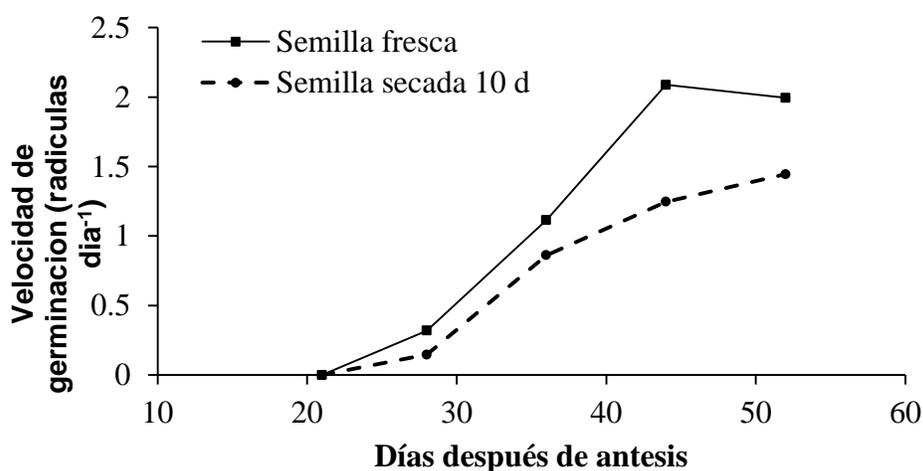


Figura 9. Protrusión radicular en semillas de chile habanero en diferentes fases de su desarrollo.

e) Cinética de la germinación

En el chile habanero la germinación inició a partir de los 6 d después de haber instalado la prueba tanto en semilla fresca como en semilla secada por 10 d. En los tratamientos de menor vigor, como la semilla cosechada 28 DDA, la germinación inicia hasta los 8 d. Así mismo las semillas obtenidas a los 21 DDA en ambos periodos de estudio, fueron incapaces de germinar (Figura 10),

posiblemente por ser aún inmaduras y contener una cantidad considerable de inhibidores de la germinación, ya que estos disminuyen conforme la semilla alcanza la madurez (Bradford, 2004).

De acuerdo con Mattews y Khajeh-Hosseini (2006), la importancia de la dinámica de la germinación radica en que muestra el posible potencial de vigor de una semilla para generar una plántula vigorosa; por lo que una germinación más lenta de un lote y con amplio tiempo o dispersión de la germinación en el tiempo produce plántulas heterogéneas y pequeñas.

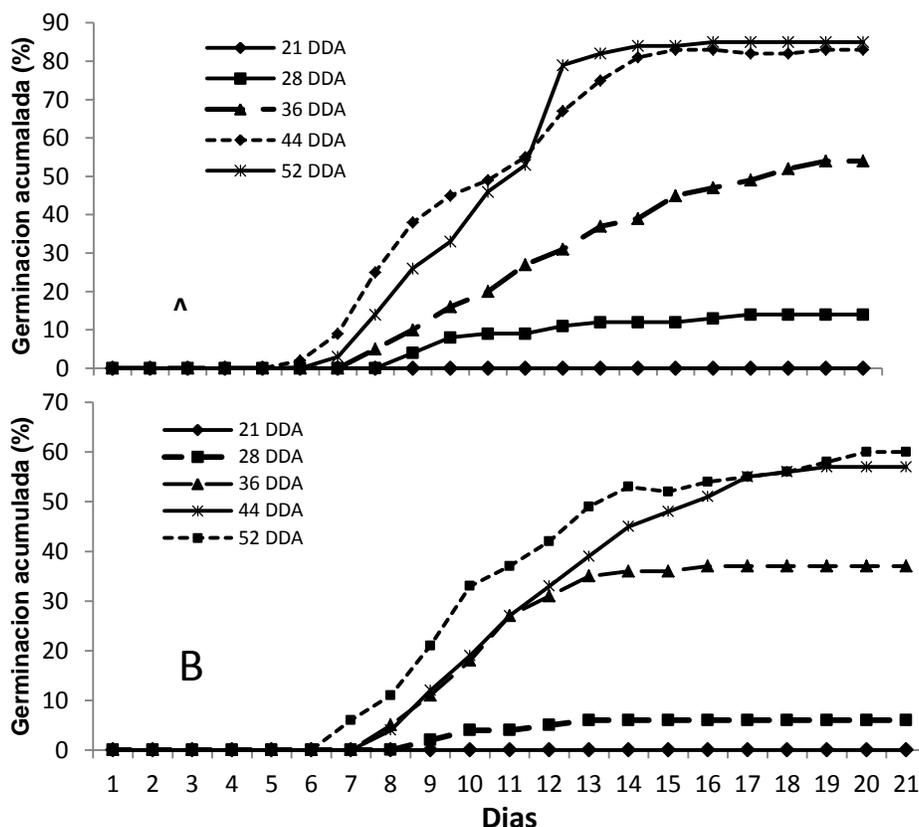


Figura 10. Germinación acumulada de semillas de chile habanero frescas (A) y semillas secadas durante 10 d (B). Obtenidas en diferentes fases de su desarrollo.

De acuerdo con la recomendación de la ISTA (2004), en la prueba estandarizada de germinación sobre papel para el género *Capsicum* spp., el primer conteo se realiza a los 6 d de iniciada la prueba y el segundo (final) a los 14 d. En este experimento se detectó que estos periodos eran insuficientes, pues la germinación resulto más lenta, observándose a los 6 d germinabilidad muy escasa y la máxima a los 21 d de iniciada la prueba, por lo que se reportó como germinación final la observada ese día. De esta manera sería importante sugerir ante la ISTA el cambio de la duración de la prueba de germinación estandarizada, al menos para la especie *C. chinense*.

f) Actividad de proteínas LEA

En la Figura 10 se observan las bandas de las proteínas existentes en el embrión y semilla de chile habanero con diferente peso molecular, las proteínas LEAs según el protocolo de Vidigal *et al* (2009) sería la P1, P2 y P3, las cuales no tienen mucha diferencia en su expresión pues se observan durante todas las fases, además, nada más varia en el grado de tinción a lo largo del desarrollo de la semilla. Entonces, es necesario realizar un estudio más detallado para identificar las proteínas que permiten adquirir tolerancia a la desecación a la semilla de Habanero y por tanto tener una certeza de cuales proteínas intervienen en dicho proceso.

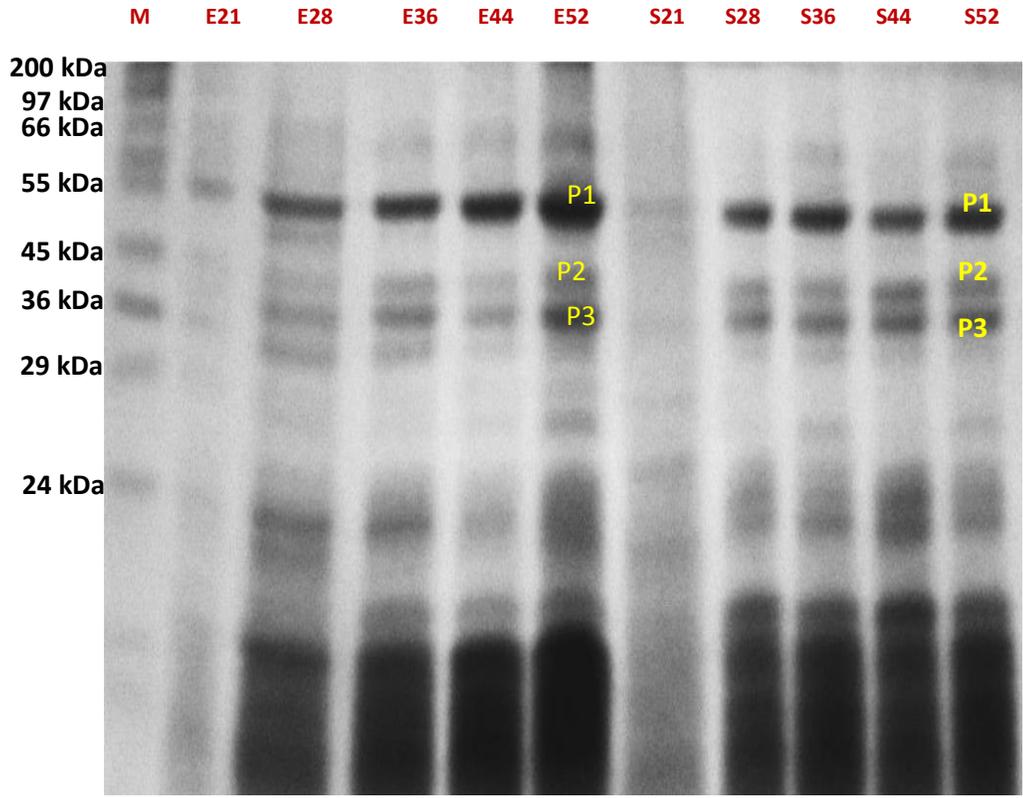


Figura 11. Gel de poliacrilamida donde se muestran las proteínas solubles presentes en el embrión (E) y semilla (S) de chile Habanero, extraídos a los 21, 28, 36, 44 y 52 d después de antesis. M= marcador molecular, P1, P2 y P3 = Posibles proteínas LEA.

5.3 Discusión general

La madurez del fruto es un factor de gran importancia en la calidad de las semillas (Sayed y Essam, 1952). En este experimento los frutos cosechados de color verde (21 a 36 DDA) dieron semillas de baja calidad; mientras que los frutos cosechados de color verde-naranja y naranja (44 y 52 DDA), fueron las que obtuvieron mayor calidad, mayor germinación y vigor (Figuras 3, 6 y 7). Algunos

trabajos han reportado la asociación entre la madurez del fruto y la de la semilla en *Capsicum annum* (Edwards y Sundstrom,1987; Valdés *et al.*,1992; Sánchez *et al.*,1993; Cavero *et al.*,1995; Ayala *et al.*, 2014), sin embargo ninguno en Chile Habanero. En el proceso de producción de semillas de esta especie existen diversas observaciones empíricas en cuanto al grado de madurez del fruto al momento de la extracción de la semilla. Sin embargo, no existe suficiente información sistematizada de trabajos de investigación sobre el desarrollo de la semilla y su efecto en la calidad de las semillas.

Durante las tres etapas del desarrollo de la semilla señaladas por Taiz y Zeiger (2010), su calidad evoluciona hasta alcanzar un punto máximo en la madurez fisiológica, y después de ésta es que inicia el deterioro. Con los resultados de este estudio se puede inferir que al no existir germinación a los 21 DDA y la poca germinación a los 28 DDA (Figura 6), las semillas se encontrarían en la etapa de histodiferenciación, donde aún no alcanzaban el desarrollo morfológico y fisiológico que permitiera una germinación adecuada (Otho *et al.*, 2007). Lo anterior se confirma con los valores de conductividad eléctrica de esas 2 fechas de madurez de fruto que son las más altas (Figura 8), un mayor flujo de solutos hacía la solución de imbibición indicaría que las membranas de los órganos aún no estaban completamente formadas y por tanto las semillas se encontraban en fase de histodiferenciación.

En los subsecuentes muestreos las semillas fueron madurando y acumulando reservas. A los 36 DDA, no obstante la baja calidad fisiológica, en esta etapa, embriones obtenidos de estas semillas podrían completar su desarrollo

en condiciones controladas *in vitro* con el fin de obtener plántulas viables (Pérez-Torenero y Porras, 2008).

Durante el desarrollo y maduración del fruto las semillas alcanzan su óptima calidad, y las semillas que fisiológicamente no han completado la maduración, tienen una baja capacidad de germinación y presentan un mayor número de plántulas anormales. Así mismo, el proceso de maduración causa la pérdida de humedad de la semilla favoreciendo la germinación como sucedió en tomate de cáscara (Pérez-Camacho *et al.*, 2008) y ocasiona la degradación de hormonas inhibitoras de la germinación (Bradford, 2004).

La pérdida de capacidad germinativa debida al secado de la semilla durante 10 d muy probablemente puede atribuirse a una nueva síntesis de inhibidores del crecimiento pues la impermeabilidad de las membranas (conductividad eléctrica) de la semillas secadas 10 d fue similar en todo el ciclo a la de las semillas frescas, así la semilla secada tendría la misma viabilidad que la semilla no secada y la diferencia en el porcentaje de germinación entre estas dos (Figura 6), se debería a este fenómeno denominado latencia secundaria (Hilhorst, 2007).

La etapa de maduración de la semilla es una característica que está directamente relacionada con el vigor, definido como la suma total de las propiedades de la semilla que determinan el nivel potencial de actividad y desarrollo durante la germinación y emergencia de la plántula en condiciones adversas (Copeland y McDonald, 2001; ISTA, 2004); por tanto las semillas maduras extraídas de frutos a los 44 y 52 DDA fueron las más vigorosas.

VI. CONCLUSIONES

En el presente experimento, la semilla de chile habanero tuvo dos fases principales de desarrollo; en la primera el crecimiento del peso de mil semillas fue constante y ocurrió desde los 22 hasta los 44 días después de anthesis (DDA) cuando llega a un máximo, en la segunda el peso se mantuvo hasta que se cosechó el fruto a los 52 DDA. El peso máximo coincidió con los valores más altos de germinación (85 % en semilla fresca) y vigor ($2.1 \text{ radículas d}^{-1}$ en velocidad de emergencia de radículas y 53 % de germinación posterior a envejecimiento acelerado, ambos en semilla fresca), lo que indicaría que la semilla se encuentra en la fase de madurez fisiológica. A los 44 DDA los frutos cosechados tenían color verde-naranja y habían alcanzado el máximo crecimiento, por lo que este color de fruto podría ser considerado como indicador de cosecha de semilla de alta calidad. El contenido de humedad de la semilla al interior del fruto se mantiene constante en 38 % a partir de 44 DDA. El mismo comportamiento se encontró en la conductividad eléctrica de la solución de imbibición con valores cercanos a $135 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$. No se encontraron proteínas LEA asociadas a mayores valores de germinación y vigor. La prueba estándar de germinación de semilla de habanero debería ser modificada en el tiempo de duración a 22 d.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Aceves, N. A. L., F. L. Juárez, J. L. Palma, R. L. López, B. H. Rivera, J. R. Rincón, A. C. Morales, R. A. Hernández, A. S. Martínez. 2008. Estudios para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), INIFAP, SAGARPA, Colegio de Postgraduados, DEIDRUS-TAB, Secretaria de Desarrollo Forestal y Pesca. Pág. 1.

Aguilar, Rincón, V. H.; T. Corona, Torres; P. López, López; L. Latournerie Moreno; M. Ramirez, Meraz; H. Villalon, Mendoza y J. A. Aguilar Castillo. 2010. Los Chiles de México y su Distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Alfenas, A.C. 2006. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. (Eletrophoretical and biochemical markers in plants and microorganisms). 2 ed. Viçosa: UFV, 627p.

Alpizar, E., A. Trujillo y Herrera F., 2003. Determinación de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) colectados en Yucatán. (En red). Disponible en: http://www.pepperconference.org/proceedings/determinación_de_capsaicinoides.pdf.

Artes, F.; Estriche, A.; Guzmán, G.; Marín, J.G. 1980. Características biotecnológicas de frutas y hortalizas destinadas a la transformación. Química y tecnología de alimentos 2:245-252.

Baskin, CC and Baskin JM, 2014. Seed Biology and Germinatum. 2do Edition Academic Press, Elsevier. San Diego, California, USA. 1600 p.

Bautista, G., 2003. Effect of clear the fruit for the quality of the seeds of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) produced in Yucatán, Mexico. (En red). Disponible en:
http://www.pepperconference.org/proocedings/effect_of_clear_the_fruit.pdf.

Bennett, M.A., A.F. Evans, and E.M. Grassbaugh. 2001. Saturated salt accelerated aging (SSAA) tests for assessing and comparing *sh2* and *se* sweet corn seedlots. Proc. Int'l Seed Testing Assoc., Angers, France; Abstracts 26:appendix p. 11.

Berjak, P. y N. Pammenter. 2004. Recalcitrant seeds. pp. 305-345. En: Benech-Arnold, R. y R. Sánchez (eds.). Handbook of seed physiology. Food Products Press, New York.

Berjak, P., Vertucci, C. W. and Pammenter, N.W., 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and

desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 155–166.

Bewley J. D., K. J. Bradford, W. M. H Hilhorst and H. Nonogaky 2013. Seed. Physiology of development, germination and dormancy. Third Edition. Springer. New York, U.S.A. 392 p.

Bewley, J. D and M. Black. 2000. Seed Technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press Ltd. Sheffield, England. 419 p.

Bhering, M.C., Dias, D.C.F.S., Vidigal, D.S. and Naveira, D.S.P. 2006. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. (Accelerated aging test in pepper seeds). *Revista Brasileira de Sementes*, **28**, 64-71. Blackman, S.A., Wettlaufer, S.H., Obendorf, R.L. and Leopold, A.C. (1991). Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. *Plant Physiology*, **96**, 868-874.

Bino, R. J., H. Jalink, M. O. Oluoch and S. P. C. Groot. 1998. Seed research for improved technologies. *Scientia Agricola* 55:19-26.

Bosland, P.W., 1996. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. En: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. Arlington, VA. ASHS Press. pp. 479-487.

Bradford, K. J. 2004. Seed Production and Quality. Department of Vegetable Crops. University of California. Davis, California, U.S.A. 134 p.

Bryant, G., and Wolfe, J., 1989. Can hydration forces induce lateral phase separations in lamellar phases. *European Biophysics Journal* 16: 369-374.

Buitink, J.; F. A. Hoekstra and O. Leprince. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. In Black M, Pritchard, HW, eds, *Dessication and Survival in Plants. Drying Without Dying*. CABI Publishing, Wallingford, U. K. pp: 293-318

Cano, M., 2003. Potencial exportable de chiles en fresco, de una zona libre de plagas. (En red). Disponible en:

<http://www.Monografias.com/trabajos/cultivochiles/cultivochiles.htm>

Cavero, J.; Ortega, RG., Zaragoza, C. 1995. Influence of fruit ripeness at the time of seed extraction on pepper (*Capsicum annuum* L.) seed germination. *Scientia Horticulturae* 60:345-352.

Cheng, S., 1989. The use of *Capsicum chinense* Sweet Pepper cultivars and source for gene transfer. En: *Tomato and Pepper production in the tropics*. IntSynp. AVRDC. Taiwan. p. 55-62.

Chile Pepper Institute, 2003. Chile Growing Tips (En red). Disponible en: <http://www.chilepepperinstitute.org/GrowingTips.htm>.

Cochrane M.P. 2000. Seed carbohydrates. En Black M, Bewley, J.D. (Eds.) Seed technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press. Sheffield, U.K. pp. 85-120.

Compton, M. E., Benton, C. M., Gray, D. J., and Songstad, D. D., 1992. Plant recovery from maize somatic embryos subjected to controlled relative humidity dehydration. *In vitro Cell Developmental Biology* 28: 197-201.

Consejo Nacional de Población y Vivienda, 1994, La Población de los Municipios de Mexico 1950-1990. Ed. UNO Servicios Graficos, Mexico.

Copeland, O. L. and McDonald, M. B. 2001. Principles of seed science and technology. 3rd ed. Chapman and Hall. New York, USA. 409 p.

Crèvecoeur, M., Deltour, R. and VandeWalle, C., 1988. DNA content and nucleic acid synthesis in dehydrated maize embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 65-71. J6

Delouche, J. C. and Baskin, C. C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Tech.* 1:427-452.

Dewitt, D. and Bosland, P., 1994. The pepper garden., Berkeley, California, USA. Ten Speed Press. pp.59-71.

Doijode, S. D. 1988. Seed storability as affected by different stage of fruit development in chilli. Veg. Sci. 15: 15-20.

Doijode, S. D. 1991. Influence of seed position in fruit on seed viability and vigour during ambient storage of chilli fruits. Capsicum Newsletter 10:62-63.

Doijode, S. D. 2001. Seed Storage of Horticultural Crops. Haworth Press. New York, USA. 339 p.

Edwards, R. L. and F. J. Sundstrom. 1987. Afterripening and harvesting effects on Tabasco pepper seed germination performance. HortScience 22:473-475.

FAO (Food and Agriculture Organization) 2011. Aquaculture topics and activities. Acuicultura. Roma. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>

Farrant, J.M., N.W. Pammenter y P. Berjak. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. Seed Sci. Res. 3, 1-13.

Fenner, M. 2000. Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. 2nd edition. CABI publishing. 410 p.

Galau, G. A., Jakobsen, K. S. and Hughes, D. W., 1991.The controls of late dicot embryogenesis and early germination. *Physiologia Plantarum* 81:280-288.

García G., J.C. 1981. Control de calidad de semillas post cosecha. Conferencia del primer curso avanzado en protección y control de calidad en semillas. Cali, Colombia.

Garruña, H. R., 2008, Factores Físicos y Tratamientos de Acondicionamiento que influyen en la germinación de semilla de Chile habanero. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Instituto Tecnológico de Conkal Yucatán, México.

Garruña, H. R., Latounerie, M. L., Ayala, G. O., Santamaría, M. J., Pinzón, L. L. 2008. Acondicionamiento pre-siembra: una opción para incrementar la germinación de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) *Revista Agrociencia* 48: 413-423.

George, R. A. T. 1999. Vegetable seed production. 2 ndEdition.CABI publishing. New York. 328 p.

González H., N. 1994. Influencia del tamaño de semilla sobre la calidad fisiológica de la simiente de frijol (*Phaseolusvulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 56 p.

Hernández, C. D. 1990. Evaluación de la calidad de semillas a diferente grado de madurez del fruto en relación a periodos de fermentación en tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) c. v. Río Grande. Tesis Profesional. Nuevo León, México. Pp. 84-89.

Heyen B.J., Alsheikh M.K., Smith E.A., Torvik C.F., Seals D.F. & Randall S.K. 2002. The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiology* **130**, 675–687.

Hilhorst H.W.M. 2007. Definitions and hypotheses of seed dormancy. *In: Seed Development, Dormancy and Germination.* K J Bradford, H Nonogaki (eds). Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp: 50-71

Hundertmark M, Hinch DK 2008. "LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*". *BMC Genomics* **9**: 118.doi:10.1186/1471-2164-9-118. PMC 2292704. PMID 18318901

ISTA (International Seed Testing Association) 2004. International Rules for Seed Testing. Rules 2004. ISTA Editions. Bassersdorf, CH-Switzerland. 243 p.

Jesiolowski, J., 1993. Grow red hot chili peppers. *Organic gardening.* p. 27-32.

Jianhua, Z. and M. McDonald. 1996. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. *Seed Science & Technol.* 25:123-131.

Katzer, G. 2003. Chile (*Capsicum frutescens* L. and others). (En red). Disponible en: http://www.Gernot%20Katzer's%20Spice%20Dictionary_archivos/Caps_fru.htm.

Kermode, A. R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev. Plant Science* 9:155-195.

Kermode, A. R., Belwey J.D. 1985. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. I. Acquisition of desiccation tolerance and germinability during development of *Ricinus communis* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 36, 1906—15

Khan, A. A. 1977. The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. North-Holland Biomedical. Amsterdam. The Netherlands. Pp. 7-225.

Kigel, J., and Galili, G., 1995. Seed development and germination. Marcel Dekker Inc. New York. 847 p.

Lai, F. M., Senaratna, T. and McKersie B., 1992. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. *Plant Science* 87: 69-77.

Latournerie M. L., J. L. Chávez, M. Pérez, G, Castaño, S. A. Rodríguez, L. M. Arias y G. Castañón. 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcaba, Yucatán. *Fitotec. Mex.* 25: 25-33.

León, J., 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales. San Jose, Costa Rica. IICA. p. 179-182.

LePrince, O., Bronchart, R. and Deltour, R., 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seeds. *Plant Cell and Environmental* 13 :539-546.

LePrince, O., Van Der Werf, A., Deltour, R. and Lambers, H., 1992. Respiratory pathways in germination maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugar. *Physiologia Plantarum* 85 : 581-588.

Long-Solís, J., 1998. Capsicum y cultura: La historia del chile. México. Fondo de Cultura Económica. 2ª. Edición. Pp.77-78.

Mayer, A. M. And Poljakoff Mayber A. 1975.The Germination of Seeds.Ed.2a edition, Pergamon. Gran Bretaña. 192 p.

Metha, V.A. and Ramakrishna, V. 1986. Effect of different pickings on the storability of chilli seeds. *MadrasAgric. J.* 75: 334-339.

Modi AT, White BJ (2004) Water potential of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) placenta and seed germination in response to desiccation during fruit development. *Seed Sci. Res.* 14: 249-257.

Mullen, R.C. 2003. Crop Science. Principles and practice. Fourth edition. Pearson custom publishing. USA. 353 p.

Navarro, R. J. 1990. Efectos de diferentes grados de madurez del fruto y periodos de fermentación de sobre la calidad de la semilla en tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) c.v. Florada de en Marín, N.L. Tesis Profesional Nuevo León, México. pp: 90-93.

Nagarajan, S.; Pandita V.K. 2001. Improvement in germination characteristics in artificially aged seeds tomato by osmoconditioning. Seed Research 29: 136-140.

Nuez, F. Ortega G., Costa, J. R. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi-Prensa Madrid-España.586 p.

Norma, Rodriguez-Avila, José A Narváez-Zapata, Margarita Aguilar-Espinosa, Renata Rivera-Madrid. 2011. Regulation of Pigment-related Genes During Flower and Fruit Development of *Bixa orellana*. Plant Molecular Biology Reporter DOI 10.1007/S11105-010-0207-z. Vol. 29, Issue 1, 43-50.

Otho M. A., S. L. Stone and J. J. Harada. 2007. Genetic control of seed development and seed mass. *In: Seed Development, Dormancy and Germination.* K J Bradford, H Nonogaki (eds). Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp:1-49.

P.I. Dobrev, L. Havlicek, M. Vágner, J. Malbeck, M. Kaminek. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075 159-166.

Panobianco, M., Marcos Filho, J. 1998. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de pimentão. *Revista Brasileira de Sementes, Pelotas*, v.20, n.2, p.306-10.

Pérez-Camacho, I., V. A. González-Hernández, J. C. Molina-Moreno, O. J. Ayala-Garay y A. Peña-Lomelí. 2008. Efecto de desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot. en germinación, vigor y contenido de azúcares. *INCI* 33(10):762-766.

Pickersgill, E., 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 25: 683-691

Robles H., J. 1992. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosfórica en el rendimiento y calidad de la semilla de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) c.v. Hidalgo. Tesis Profesional Nuevo León, México.

Rodríguez Burgos A, O. J. Ayala Garay, Hernández Livera A, V. M. Leal León y E. Cortez Mondaca. 2011. Desarrollo de fruto y semilla de cinco variedades de tomate de cáscara en Sinaloa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2: 51: 673-687

Röhrig H, Schmidt J, Colby T, Brautigam A, Hufnagel P, Bartels D. 2006. Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1606–1617.

Salazar-Olivo, L. A. y C. O. Silva-Ortega. 2004. Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta* 1: 7-14.

Salunkhe D. K. 2003. Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas: producción, composición, almacenamiento y procesado. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza, España. 739 p.

Sánchez, V. M., F. J. Sundstrom, G. N. McClure and N. S. Lang. 1993. Fruit maturity, storage and postharvest treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae*, 54:191-201.

Sánchez, V. M., Sundstrom, F., McClure, G.N., and Lang, N.S. 1993. Fruit Maturity, storage and postharvest maturation affects bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae* 54: 191-201.

Santana Buzzy, N., Canto Flick, A., Zaldivar Colli, A. y Trujillo, J., 2003. Effect of different factors on the morphogenesis of chile habanero (*Capsicum chinense*) *in vitro*. (English). Disponible en: http://www.pepperconference.org/proceedings/effect_of_different_factors.pdf.

SAS Institute 2003. User's Guide of SAS (Statistical Analysis System) version 9. 1.3. SAS Institute Cary, North Carolina, USA. 550 p

Sayed, M. S. and M. Essam. 1952. Viability of seeds harvested from fruits at different stages of maturity. *Proceedings of American Society for Horticultural Science* 60:327-329.

Sayed, M. Saakr and Essam Mahmoud, El-Din. 1952. Viability of seeds harvested from fruits at different stages of maturity. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 60:327-329.

Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F., and Bartels, D., 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic

proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189: 120-131.

SFE Secretaría de Fomento Económico. 2011. Perfil de producto chile habanero. (En red). Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/59874481/Manual-del-Chile-Habanero>

Shih, M.D., F.A. Hoekstra, and Y.I.C. Hsing. 2008. Late embryo- genesis abundant proteins. *Adv. Bot. Res.* **48**: 211-255.

SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009. Chile habanero de la península de Yucatán. (En red). Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=338:chile-habanero-de-la-peninsula-de-yucatan&catid=91:infogramas&Itemid=570

Soria, M., A. Trejo, J. Tun, y R. Terán. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). SEP. DGETA. ITA-2. Conkal, Yucatán, México.

Taiz L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5th ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.

Tunnacliffe, A. and Wise, M. J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94: 791-812.

USDA Natural Resources Conservation Service. 2003. Plants National database. (En red). Disponible en:

http://www.plants.usda.gov/cgi_bin/plant_profile.cgi?simbol=CACH30.

Valdés, V., P. Anguita y C. Ulriksen. 1992. Efecto del estado de madurez de los frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) sobre la calidad de la semilla [Keystone Giant Resistant, Maor]. Ciencia e Investigación Agraria 19(1-2):3-7.

Vidigal, D. S., D. C. F. S. Días, E.R.V. Von Phino and L. A. S. Dias. 2009. Sweet pepper seed quality and lea-protein activity in relation to fruit maturation and post-harvest storage. Seed Science and Technology 37:192-201.

Wang, S Curtarolo, Chao Jiang, R Arroyave, T Wang, G Ceder, L-Q Chen, Z-K Liu. 2004. Ab initio lattice stability in comparison with CALPHAD lattice stability. Calphad 28 (1), 79-90.

Wurr, D. C. E. and J. R. Fellows. 1983. The effect of the time of seedling emergence of crisp lettuce on the time of maturity and head weight at maturity. Journal of Horticultural Science 58:561-566.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Otros protocolos se pusieron a punto durante esta tesis y que no se utilizaron por diversas razones, son los protocolos para evaluar en las semillas de chile habanero:

1.1 Contenido de carbohidratos

Se utilizó un gramo de semilla previamente liofilizada, de la que 50 mg fueron macerados en un mortero y se homogeneizó en 1 mL de etanol 75 % que contenía 500µg de manitol. El homogeneizado se centrifugó a 3000 G por 5 min a 18 °C y el sobrenadante se secó a 75 °C resuspendiendo el residuo en 1 mL de agua ultra pura. Para eliminar fenoles y partículas iónicas, el extracto se filtró en una columna empacada con 0.5 mL de polivinilpirrolidona, 0.5 mL de Amberlita y 1 mL de Dowex, y se inyectó en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC). La columna utilizada fue de 300 mm x 7.8- µm con flujo de 0.5 µm•mm-1, a una temperatura de 80 °C. Previo a la inyección de la muestra, la columna se lavó con 10 mL de agua ultrapura y se inyectaron estándares internos de sacarosa, rafinosa, glucosa, fructosa y sorbitol.

ANEXO II

2.1 Análisis de ácido abscísico (ABA) en semillas de Chile habanero por HPLC.

Se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de plantas del Centro de investigación Científica del estado de Yucatán, bajo la supervisión de la M. C. Margarita Aguilar Espinosa.

Procesamiento de las muestras

Las semillas de chile habanero colectadas en diferentes etapas de desarrollo, se envolvieron en papel aluminio y se congelaron en nitrógeno líquido (-196°C). Posterior a ello se dejaron en el Ultracongelador (a -80°C) dentro de un vaso cubierto con una malla de algodón mientras se continuaba con su proceso. Se liofilizaron (-50 °C) por dos días e inmediatamente de retirarlas de la liofilizadora, se colocaron los sobrecitos de aluminio en tubos falcón de 15 ml y se sellaron las tapas con parafilm para que no se hidraten. Cada muestra fue pulverizada usando un mortero de porcelana, el polvo obtenido se guardó en tubos eppendorf de 2 ml. Se pesó 10 mg de cada muestra y se sellaron con parafina y se guardaron a -20°C.

A los 10 mg de muestra pulverizada se les puso 1 ml de la mezcla de la fase móvil Acetonitrilo/metano/isopropanol ; 75:10:15, se mezclaron bien se sonicó por 3 minutos se dejó en hielo 30min. Después se mezcló nuevamente por vortex

y se centrifugaron por 20 minutos a 14000 rpm y 4°C. Luego se filtraron usando un filtro de nylon de 22 µC, Los filtrados se pusieron en tubos ambar de 2 ml, se guardaron a -80°C hasta su inyección. Todos los reactivos usados fueron grado HPLC filtrados y sonicados.

Preparación de la fase móvil

La fase móvil usada fue acetonitrilo, metanol e isopropanol: 75:10:15. Todos grado HPLC. Se usó una columna de Hipersil de fase reversa ODS C18 de 250mm de longitud x 4.6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula. El flujo usado fue 1 ml /min y 25 °C. Todos los solventes antes de conectarlos al equipo cromatográfico fueron filtrados con filtro de nylon de 22 µm y después sonicados por 20 minutos a temperatura ambiente (25°C).

Equipo usado y calibración de la columna

Se usó un equipo de HPLC Modelo Agilent 1200 con arreglo de diodos. Se usaron dos longitudes de onda la de 280°C y la de 450°C. El ABA se detectó para este sistema de solventes en λ 280nm. La calibración de la columna se hizo como indica el instructivo y una vez obtenida la línea base se procedió a inyectar las muestras.

Preparación de la curva estándar con el ácido abscísico (ABA)

Para la curva estándar se preparó un stock de ABA 10 mg/ml (1mg/ml) marca sigma # de catálogo A1049 se disolvió en metanol grado HPLC filtrado con filtros de nylon de 22 µm. Se hizo una curva patrón con 0.5 µg/ml , 2.0 µg/ml , 4.0 µg/ml , 6.0 µg/ml , 8.0 µg/ml y 10 µg/ml. .

Desarrollo del método en el HPLC para el análisis del Estándar ABA

Se usó el método propuesto por (Rodriguez-Avila, *et al* 2011) al cual se le hicieron adecuaciones ya que se omitió el Tetrahidrofurano (THF) y se substituyó por acetonitrilo al 100%.

En este método se usó la columna C18, se usó un flujo de 1 ml/min, la fase A fue acetonitrilo para calibrar y lavar la columna y la fase B fue la mezcla de acetonitrilo:metanol: isopropanol ; 75:10:15. La columna se dejó a 25° C, se inyectó 20 µl de cada muestra en lugar de 25µl. Se corrió con la fase móvil B 100% de 0-30 minutos y se pasó a la fase móvil A 100% por 8 minutos y de aquí se regresó a la fase móvil B para inyectar nuevamente entre muestra y muestra

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en los primeros cromatogramas mostraron una señal equivalente en el tiempo de retención del ABA pero acompañado con una sustancia que se le suma lo que hace que la señal sea más robusta.

Para poder mejorar la respuesta se hicieron varios cambios con los solventes de la fase móvil y los resultados que arrojó este estudio no mejoró en relación al estándar de ABA analizado bajo esas mismas condiciones sin embargo el ABA no cambio su tiempo de retención (2.75).

Conclusiones

En los tres sistemas de fase móvil modificado no se obtuvo una mejor separación del metabolito pegado al ABA de las muestras. En la literatura se menciona que ABA y el ácido indolacético (IAA) tienen propiedades químicas similares las cuales podrían aprovecharse para su purificación cromatográfica. Ambos compuestos son hidrofóbicos y contienen un grupo carboxílico por lo tanto cuando son extraídas y purificadas del material vegetal por técnicas cromatográficas estos compuestos a menudo son obtenidos en la misma fracción(P.I. Dobrev *et al.* 2005)). Por tal razón es muy difícil su separación. Debido a esto muchos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar métodos alternativos para llevar a cabo el aislamiento, identificación y cuantificación del ABA en diferentes modelos vegetales. Los métodos existentes son muy costosos porque requieren de equipos cromatograficos y solventes de alto precio. Cabe destacar que el método propuesto por en el artículo funcionó muy bien para *Bixa orellana* (achiote).